

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR MEDIZINISCHE ZELLBIOLOGIE
PROF. DR. MED. RICHARD WARTH

FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Renale Elektrolyt-Volumen-Homöostase und
basolaterale Kaliumleitfähigkeit
des distalen Konvoluts -
ontogenetische und pathophysiologische Aspekte**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der

Fakultät für Medizin

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Katharina Maria Schmidt

2014

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Richard Warth
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Bernhard Banas
Tag der mündlichen Prüfung:	07.07.2014

MEINEN ELTERN

JOHANNA UND MICHAEL

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	5
1.1	Grundlagen der Nierenfunktion	5
1.2	Beteiligung der Niere an der Elektrolyt-Homöostase	5
1.3	Entwicklung der Niere	8
1.3.1	Organogenese und Morphogenese	8
1.3.2	Funktionelle Reifung	8
1.4	Bedeutung der Kaliumleitfähigkeit für die Transportfunktion des distalen Konvoluts	11
1.5	KCNJ10 und KCNJ16 – Kaliumeinwärtsgleichrichter im basolateralen DCT	13
1.5.1	Eigenschaften und Regulation von KCNJ10 und KCNJ16	13
1.5.2	Organspezifische Expression und Funktion von KCNJ10 und KCNJ16	14
1.5.3	KCNJ10-Knockout-Maus und ihr ZNS-Phänotyp	16
1.6	Hereditäre hypokaliämische Salzverlust-Tubulopathien	17
1.6.1	Antenatales Bartter-Syndrom (BS Typ I und II)	17
1.6.2	Klassisches Bartter-Syndrom (BS Typ III)	18
1.6.3	Bartter-Syndrom mit sensorineuraler Taubheit (BS Typ IV)	18
1.6.4	Gitelman-Syndrom (GS)	18
1.7	EAST/SeSAME – eine „neue“ und seltene Tubulopathie	19
1.7.1	Klinischer Befund – neurologische und renale Funktionsstörungen	19
1.7.2	Genetischer Aspekt – autosomal-rezessiver Erbgang und „loss-of-function“ des KCNJ10	20
1.7.3	Funktionelle Analysen – genmanipulierte Tiermodelle und heterologe Expressionssysteme	20
2	ZIELSETZUNG	22
2.1	Postnatale Nierenentwicklung	22
2.2	Warum verursachen Mutationen des KCNJ10 ein Salzverlustsyndrom?	22
3	MATERIAL UND METHODEN	24
3.1	Material	24
3.1.1	Geräte	24
3.1.2	Verbrauchsmaterial	25
3.1.3	Chemikalien, Enzyme, Kits	25
3.1.4	Puffer und Lösungen	27

3.1.5	Oligonukleotide	28
3.1.6	Plasmide	28
3.1.7	Antikörper / Fluoreszenzfarbstoffe	29
3.1.8	Mäuse, Zellen	29
3.1.9	Software und Online-Dienste	29
3.2	Tierexperimente	30
3.2.1	Versuchstiere und Genotypisierung der KCNJ10-Knockout-Maus	30
3.2.2	Entwicklungsstudien an Wildtyp-Mäusen und KCNJ10-Knockout-Mäusen	31
3.2.3	Statistische Auswertung und Darstellung der Daten	31
3.3	Histologische Verfahren	32
3.3.1	Gewebefixierung durch arterielle Perfusion	32
3.3.2	Immunfluoreszenzfärbungen auf Gefrierschnitten	33
3.3.3	Hämatoxylin/Eosin-Färbung (HE-Färbung) auf Paraffinschnitten	33
3.3.4	Mikroskopie	34
3.4	Molekularbiologische Methoden	35
3.4.1	Polymerasekettenreaktion	35
3.4.2	Restriktionsverdau und Dephosphorylierung	36
3.4.3	Ligation	37
3.4.4	Transformation	37
3.4.5	Übernachtskulturen	38
3.5	Zellkultur	39
3.5.1	Aussäen	39
3.5.2	Transfektion	39
3.6	Elektrophysiologie – Patch-Clamp-Technik	41
3.6.1	Whole-cell-Experimente	41
3.6.2	Einzelkanal-Experimente	42
3.6.3	Erhebung und Darstellung der Daten	42
4	ERGEBNISSE	43
4.1	Entwicklungsprofil von Wildtyp-Mäusen	43
4.1.1	Körperwachstum	43
4.1.2	Morphologie und Transportproteinexpression in der Niere	44
4.1.2.1	Morphologie	44
4.1.2.2	Entwicklung der Transportproteinexpression	46
4.1.3	Renale Ausscheidungsfunktion: Kreatinin und Kationen	53
4.1.3.1	Kreatinin	53
4.1.3.2	Kationen	53

4.2	Renaler Phänotyp der KCNJ10-Knockout-Maus	56
4.2.1	Überleben und Körperwachstum – Wildtypen, Heterozygote und Knockouts	56
4.2.2	Morphologie einer KCNJ10-Knockout-Niere	57
4.2.3	Renale Ausscheidungsfunktion – Wildtypen, Heterozygote und Knockouts	57
4.2.3.1	Kreatinin	58
4.2.3.2	Kationen	58
4.3	Elektrophysiologie – hKCNJ10, hKCNJ16 und die Mutation hKCNJ10 R65P	60
4.3.1	Whole-cell-Experimente: Membranpotential und Barium-Effekt	60
4.3.2	Einzelkanal-Experimente: Einzelkanalstrom und Offenwahrscheinlichkeit	63
5	DISKUSSION	64
5.1	Dynamik der renalen Entwicklung bei C57BL6-Mäusen	64
5.1.1	Versuchstier Maus	64
5.1.2	Strukturelle und funktionelle Ontogenese der Niere	64
5.1.2.1	Renaler Wassermetabolismus	65
5.1.2.2	Renale Elektrolytausscheidung	66
5.1.2.3	Kreatininkonzentration – ein kritischer Parameter	69
5.1.2.4	Schlussfolgerung	69
5.2	Physiologische und pathologische Eigenschaften der Kaliumkanäle KCNJ10 und KCNJ16	70
5.2.1	Bedeutung des KCNJ10 und KCNK16 für die renale Elektrolythomöostase	70
5.2.2	Entwicklungsabhängige Expression von KCNJ10 und KCNJ16 in der Niere von WT-Mäusen	72
5.2.3	Renaler Phänotyp der KCNJ10-Knockout-Maus	73
5.2.3.1	Postnatale Entwicklung und Nephrogenese	73
5.2.3.2	Renale Ausscheidungsfunktion	74
5.3	Elektrophysiologische und biochemische Aspekte einiger EAST/SeSAME-Mutanten, insbesondere KCNJ10 R65P	78
5.3.1	Elektrophysiologische Eigenschaften der Mutante KCNJ10 R65P sowie der Einfluss der Heteromerbildung mit KCNJ16 WT	78
5.3.2	EAST/SeSAME-Mutationen der ersten Transmembrandomäne – Lokalisation, Funktion und Protein Alignment	79
5.3.3	Einige EAST/SeSAME-Mutationen verändern die pH-Sensitivität	81
6	ZUSAMMENFASSUNG	84
7	LITERATURVERZEICHNIS	86
8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	96

9	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	98
10	ANHANG	100
10.1	Bisherige Veröffentlichungen und Kongressbeiträge	100
10.2	Eidesstattliche Erklärung	101
11	DANKSAGUNG	102

1 Einleitung

1.1 Grundlagen der Nierenfunktion

„La fixité du milieu intérieur est la condition d'une vie libre et indépendante.“ [1, 2]

Claude Bernard, 1813-1878, französischer Arzt und Physiologe

Begründer der experimentellen Medizin

Die paarig angelegte Niere, eines der bestdurchbluteten Organe des Säugerorganismus, darf zweifelsohne als „Wächter über das innere Milieu“ angesehen werden. Zu den renalen Aufgaben zählen im Wesentlichen [3]:

- die Filtration des Blutes und die Exkretion endogener und exogener Toxine.
- die Regulation des Volumenstatus, des Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalts.
- die Synthese und Sekretion von Hormonen, welche hämodynamisch (Renin-Angiotensin-Aldosteron-System) und hämatopoetisch (Erythropoietin) wirksam sind sowie den Calcium-Metabolismus (Calcitriol) beeinflussen.

Des Weiteren beteiligt sich die Niere am Intermediärstoffwechsel, wie der Gluconeogenese und dem Aminosäuremetabolismus. Außerdem produziert dieses Organ eine Reihe von autokrin und parakrin wirksamen Substanzen, z.B. Prostaglandine und Kinine.

Das morphologische Korrelat dieser komplexen Funktionen ist eine hoch spezialisierte Histoarchitektur, die aus den harnleitenden epithelialen Anteilen, einem reich verzweigten Gefäßsystem und dem interstitiellen Bindegewebe besteht.

Aufgrund der zentralen Bedeutung der Nieren für den Salz- und Wasserhaushalt können kleinste funktionelle Störungen zu lebensbedrohlichen Zuständen führen und insbesondere im noch unreifenden Organismus bleibende Schäden hinterlassen.

1.2 Beteiligung der Niere an der Elektrolyt-Homöostase

Kalium, Natrium, Calcium und Magnesium, die wichtigsten anorganischen Kationen des Blutplasmas, erfüllen lebensnotwendige Aufgaben im Organismus. Für die normale Funktion von Zellen und Organen muss die Plasmakonzentration der einzelnen Ionen bei unterschiedlichsten Umweltbedingungen in engen Grenzen konstant gehalten werden. Die Niere spielt für die Aufrechterhaltung dieser Elektrolythomöostase die entscheidende Rolle.

Alle vier genannten Kationen, sofern nicht proteingebunden, werden ungehindert glomerulär filtriert. Bezogen auf Natrium entspricht dies bei einer glomerulären Filtrationsrate (GFR) von 180 l pro Tag der Menge an Natrium, welche in 1,5 kg Kochsalz enthalten ist. Je nach Bedarf werden die filtrierten Ionen im harnleitenden Tubulussystem weitgehend reabsorbiert, um einen inadäquaten Elektrolytverlust zu vermeiden.

Im **proximalen Tubulus (PT)** findet „Massentransport“ statt. Hier werden dem Primärharn 60-70% des filtrierten Wassers, Na^+ , K^+ und Ca^{2+} bzw. 15% des filtrierten Mg^{2+} entzogen. Die Energie für diese Transportprozesse generiert die basolaterale Na^+/K^+ -ATPase. Sie ermöglicht eine sekundär-aktive transzelluläre Na^+ -Resorption – gekoppelt an den Symport oder Antiport weiterer Substanzen – und erzeugt dadurch transepitheliale osmotische und elektrochemische Gradienten, die ihrerseits die Triebkraft des parazellulären Salztransports darstellen. Der parazelluläre Transport ist aufgrund der hohen Durchlässigkeit der Interzellularkontakte im proximalen Tubulus besonders ausgeprägt.

Die **Henle-Schleife** fördert in ihrem distalen Anteil, der **dicken aufsteigenden Schleife (TAL)**, große Mengen an Salz vom Lumen ins Interstitium: 25-30% des filtrierten Na^+ , K^+ und Ca^{2+} bzw. 60% des Mg^{2+} . Im Vergleich zum proximalen Tubulus kommt hier dem transzellulären Transport mehr Bedeutung zu, auch wenn etwa die Hälfte der Ionen das Epithel parazellulär passiert. Der TAL-spezifische, bumetanid- bzw. furosemidsensitive luminale $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Cotransporter NKCC2 holt sekundär-aktiv Na^+ , K^+ und Cl^- in die Zelle. Diese Ionen werden großteils basolateral über selektive Kanäle und über die Na^+/K^+ -ATPase ausgeschleust. Das luminale K^+ -Recycling übernimmt der Kaliumkanal ROMK, welcher intrazelluläres K^+ ins Lumen sezerniert und damit den Cotransport am NKCC2 unterhält. Ca^{2+} und Mg^{2+} werden gemeinsam mit Na^+ parazellulär transportiert, wobei das lumenpositive transepitheliale Potential (LPTP) diesen Prozess antreibt.

Nach der Macula densa geht die TAL in das **distale Konvolut (DCT)** über, wo weitere 5-10% des filtrierten Na^+ , Mg^{2+} und Ca^{2+} reabsorbiert werden. Im Unterschied zu den proximal gelegenen Nephronsegmenten vollzieht sich der Salztransport im DCT weitgehend transzellulär, was mit einem erheblich höheren Energieaufwand verbunden ist [4]. Dies manifestiert sich morphologisch durch tiefe basolaterale Invaginationen und einen hohen Mitochondriengehalt. Na^+ gelangt mittels des luminalen thiazidsensitiven NaCl -Cotransporter NCC sekundär-aktiv in die Zelle (s. Abb. 1.2). Ca^{2+} und Mg^{2+} überwinden die luminale Membran dank selektiver Kanäle der TRP(transient receptor potential)-Superfamilie, diffundieren dann gebunden an die Transportproteine Calbindin-D28K und Parvalbumin zur basolateralen Membran, wo sie die Zelle aktiv über ATPasen oder einen Na^+ -gekoppelten Symport verlassen [5, 6].

Der K^+ -Transport im DCT ist zwar hinsichtlich des Netto-Transports zu vernachlässigen, er ist aber im Konzert der anderen Transportmechanismen für dieses Nephronsegment von fundamentaler Bedeutung (s. Kap. 1.4).

Offensichtlich werden im distalen Tubulus (TAL, DCT, CNT) die Weichen der Mg^{2+} - und Ca^{2+} -Homöostase gestellt. *Erstens* ist der DCT neben der TAL Angriffspunkt der calcio- und magnesiotropen Hormone Parathormon und Calcitriol. *Zweitens* wird hier die Resorption der bivalenten Kationen Mg^{2+} und Ca^{2+} über den basolateral gelegenen Calcium-Sensing-Receptor (CaSR) gesteuert. *Drittens* ist der DCT das letzte Nephronsegment, in dem Mg^{2+} rückresorbiert wird, so dass sämtliches Mg^{2+} , was hier im Lumen verbleibt, mit dem Urin ausgeschieden wird [6, 7]. Außerdem kann der proximale Tubulus bei einer verminderten Resorption im DCT seine Resorptionsleistung für Mg^{2+} nicht – wie für Na^+ und Ca^{2+} – kompensatorisch steigern [4].

Der **Verbindungstubulus (CNT)** leitet das distale Konvolut in das Sammelrohr über. Er präsentiert Eigenschaften, die sowohl dem vorangehenden als auch dem nachfolgenden Segment zuzurechnen sind.

Im **Sammelrohr (CD)** findet die Feinregulation des Wasser-, Na^+ - und K^+ - und H^+ -Haushalts statt, was vorrangig über transzellulären Transport erfolgt. Unter der Kontrolle mehrerer endokriner Faktoren, insbesondere des Aldosterons und des antidiuretischen Hormons (ADH), kann dem Harn das verbliebene Na^+ und Wasser nahezu vollständig entzogen werden. Der atriale natriuretische Faktor (ANF) zeigt die entgegengesetzte Wirkung. Außerdem wird die Na^+ -Resorptionsrate vom luminalen Na^+ -Gehalt beeinflusst. K^+ wird im CD bedarfsabhängig resorbiert oder sezerniert, so dass die fraktionelle Ausscheidung von 2% bis 150% [8] variiert.

Im Gegensatz zu den bisher besprochenen Tubulussegmenten verlaufen der Na^+ - und K^+ -Transport im Sammelrohr gegensinnig: Eine vermehrte Na^+ -Resorption stimuliert die K^+ -Ausscheidung. Auch eine erhöhte Harnströmungsgeschwindigkeit, ein erhöhtes Serum- K^+ sowie eine alkalotische Stoffwechsellage haben kaliuretische Wirkung [8].

Das morphologische Korrelat dieser Transportprozesse bilden zwei Zellpopulationen eines dichten Epithels. Die Hauptzellen als Wirkungsort von Aldosteron und ADH resorbieren Na^+ und Wasser, zudem sezernieren sie K^+ . Die Schaltzellen stehen im Dienst der K^+ -Aufnahme bzw. der Säure-Basen-Regulation: Typ-A-Schaltzellen exportieren über eine luminal H^+ -ATPase und H^+/K^+ -ATPase Protonen und resorbieren K^+ , die selteneren Typ-B-Schaltzellen transportieren bei Alkalose Bikarbonat ins Lumen [9].

Die Zusammenschau aller Nephronsegmente und ihrer Funktionen macht die enge Verzahnung des gesamten Elektrolyt-, Wasser und H^+ -Haushalts deutlich. So wird verständlich, dass Defekte einer einzelnen Achse das gesamte System empfindlich stören können.

1.3 Entwicklung der Niere

1.3.1 Organogenese und Morphogenese

Im Säugetier vollzieht sich die Nephrogenese in kraniokaudaler Richtung. Initial formieren sich aus den cervikalen und thorakalen Anteilen des intermediären Mesoderms Übergangsorgane (*Pronephros* und *Mesonephros*), die später von der in der Beckenregion gelegenen, definitiven Niere (*Metanephros*) ersetzt werden. In einem induktiven Wechselspiel zwischen der Ureterknospe, eine Aussprossung des Urnierengangs, und dem metanephrogenen Blastem entwickelt sich das Nierenparenchym. Die Ureterknospe differenziert sich nach mehrfacher dichotomer Teilung in Nierenbecken und Nierenkelche sowie Sammelrohre. Letztere sprossen in das metanephrogene Blastem ein und induzieren die Formation neuer Nephrone. Die zunächst blind endenden Sammelrohre gewinnen sekundär Anschluss an die Tubuli [10].

Die Bildung der Nephrone findet in der subkapsulär gelegenen „nephrogenen Zone“ statt, die sich allmählich nach peripher verlagert. So kommen die ausdifferenzierten Nephrone in tiefen marknahen Kortextregionen, die unreifen Strukturen in der Peripherie zu liegen. Diese Vorgänge spiegeln sich in einem zentrifugalen Reifungsmuster wider [11].

Verglichen mit anderen Organen erstreckt sich die Entwicklung der Niere, speziell die Formation neuer Nephrone, über einen weiten Zeitraum. In der Ratte beginnt die Nephrogenese der definitiven Niere um den 12. Schwangerschaftstag und wird erst gegen Ende der ersten Lebenswoche abgeschlossen. Also liegen während der ersten postpartalen Tage alle nephrogenen Entwicklungsstadien nebeneinander vor. Beim Menschen beginnt die Induktion der bleibenden Nephrone in der 8. Schwangerschaftswoche und endet zwischen der 28. und 36. Schwangerschaftswoche, so dass nur bei Frühgeborenen die Nephrogenese postpartal anhält [12, 13].

1.3.2 Funktionelle Reifung

Parallel zur Morphogenese konstituieren sich die einzelnen Funktionen der Niere, wobei die Salz- und Wasserresorption erst im Laufe der ersten Lebenswochen ihre endgültige Kapazität erreichen. Aufgrund von Reifungsunterschieden zwischen Mensch und Nagetier beobachtet man an den Versuchstieren Ratte, Maus oder Kaninchen derartige Entwicklungsstufen, die der humane Organismus in utero vollzieht oder die bei Frühgeborenen auftreten und dort zu Komplikationen führen [14].

Glomeruläre Filtrationsrate (GFR). Die glomeruläre Filtrationsrate bezogen auf die Körperoberfläche beträgt bei Geburt nur einen Bruchteil derer eines Erwachsenen. Dies ist sowohl anatomisch mit einer kleineren Anzahl an voll leistungsfähigen Nephronen als auch funktionell als Anpassung an eine noch eingeschränkte Resorptionskapazität zu begründen [14, 15].

Na⁺/K⁺-ATPase. Die Na⁺/K⁺-ATPase, Motor des transepithelialen tubulären Transports, beeinflusst durch ihre entwicklungsabhängige Aktivitätsänderung das gesamte Transportgeschehen. An Kaninchen-Tubuli konnten Schmidt et Horster [16] nachweisen, dass die Enzymaktivität in Neugeborenen um 40-80% niedriger lag als in Erwachsenen (s. Abb. 1.1 A). Ein rasanter Anstieg der ATPase-Aktivität findet während des Abstillens statt; in den Wochen davor und danach vollziehen sich hingegen nur mäßige Veränderungen [17]. Aufgrund des engen funktionellen Zusammenhangs zeigen Zelloberfläche und Mitochondriendichte eine analoge Entwicklung. Die Studie von Schmidt et Horster [16] illustriert außerdem ein vom Alter der Tiere unabhängiges Enzymverteilungsmuster entlang des Nephrons, welches Rückschlüsse auf die Transportkapazität der jeweiligen Segmente zulässt (s. Abb. 1.1 A).

Salzresorption. Synchron zur GFR steigt der transepitheliale Stofftransport, speziell die Salzresorption. Limitierende Faktoren zu Beginn der postnatalen Ontogenese sind die eingeschränkte Na⁺/K⁺-ATPase-Aktivität (s.o.), eine geringe Expression funktionstüchtiger Transportproteine [14, 18, 19], die noch relativ kleine Zelloberfläche [16] und die unreife parazelluläre Permeabilität [14, 19-21].

Besonders interessant stellen sich die reifungsbedingten Veränderungen des Na⁺- und K⁺-Transports im distalen Nephron (distales Konvolut und Sammelrohr) dar.

Im distalen Konvolut wird die luminale Na⁺-Resorption im Wesentlichen vom NaCl-Cotransporter NCC bewerkstelligt. In den frühen Entwicklungsstadien ist der NCC aber lediglich in den distalen Anteilen des DCT nachweisbar. Erst allmählich schreitet dessen Expression bis zur Macula densa fort [15] und steigert damit die Transportkapazität des DCT.

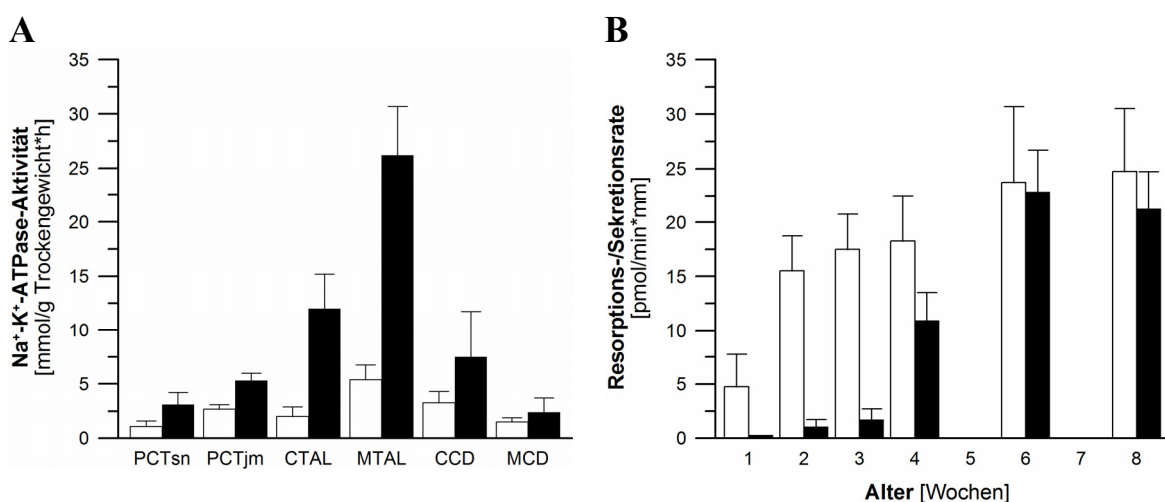


Abb. 1.1: Ontogenese der Niere: Na⁺/K⁺-ATPase und Salztransport im Sammelrohr. A Verteilung der Na⁺/K⁺-ATPase-Aktivität entlang des neonatalen (weiß) und adulten (schwarz) Kaninchen-Nephrons (PCTsn/jm: proximale convoluted tubule, superficial nephron/juxtamedullary nephron, CTAL/MTAL: cortical/medullary thick ascending limb, CCD/MCD: cortical/medullary collecting duct; nach [16]). B Altersabhängige Zunahme der Na⁺-Resorption und K⁺-Sekretion im Sammelrohr des Säugtiers. Na⁺-Resorption (weiß) und K⁺-Sekretion (schwarz) (nach [20]).

Das neonatale Sammelrohr hat für eine hinreichende Na^+ - und K^+ -Retention zu sorgen, denn sämtliche Wachstumsprozesse sind auf ein adäquates Elektrolytangebot angewiesen. Das humane Neugeborene besitzt bereits die Fähigkeit zur Na^+ - und K^+ -Retention [14, 22, 23], während Nager kurz nach der Geburt noch vermehrt Na^+ verlieren [19, 24]. Die typische Kopplung von Na^+ -Resorption und K^+ -Sekretion entwickelt sich bei Nagern im ersten Lebensmonat, wobei die beiden Transportprozesse unterschiedlich rasch ausreifen (s. Abb. 1.1 B) [20, 24].

Die frühzeitige Steigerung der Na^+ -Resorption beruht auf der Zunahme des transzellulären Na^+ -Transports, der durch die starke Expression der basolateralen Na^+/K^+ -ATPase und des luminalen epithelialen Natriumkanals (EnaC) in den Hauptzellen ermöglicht wird. Zeitgleich reifen die Interzellularkontakte zu dichten Schlussleisten aus. Diese unterbinden den parazellulären Ionenfluss und schaffen die Grundlage für transepitheliale Gradienten [14, 19, 20].

Voraussetzung für die K^+ -Sekretion sind einerseits das lumennegative transepitheliale Potential (LNTP), das durch den Na^+ -Einstrom in die Hauptzellen erzeugt wird, und andererseits die luminale K^+ -Leitfähigkeit, die durch die verzögerte Expression der Kanäle ROMK und Maxi-K sichergestellt wird [20].

Die Unreife bezüglich der Regulation manifestiert sich in einer vorübergehenden Unempfindlichkeit der neonatalen Hauptzelle gegenüber dem Mineralocorticoid Aldosteron, das in der adulten Niere die Na^+ - und K^+ -Balance maßgeblich steuert. Da Aldosteron im Neonaten hohe Plasmaspiegel aufweist und intrazelluläre Mineralocorticoidrezeptoren ausreichend vorliegen, ist die Hyposensitivität als „Post-Rezeptor-Effekt“ zu werten, also als Defizit, das in der intrazellulären Signaltransduktion lokalisiert ist [21, 23, 25].

Wassermetabolismus und Harnkonzentrierung. Neonaten reagieren außerordentlich empfindlich gegenüber Hypo- oder Hyperhydratation, was auf eine defizitäre renale Volumenregulation zurückzuführen ist, speziell auf eine limitierte Harnkonzentrierung im Sammelrohr.

Um den Harn zu konzentrieren, bedarf es **(1)** einer komplexen Histoarchitektur des Nierenparenchyms, i.e. Henle-Schleifen, die weit ins innere Mark reichen, **(2)** eines osmotischen Gradienten im Nierenmark, erzeugt durch die interstitielle Akkumulation von Harnstoff und Na^+ dank der TAL, **(3)** der Ausschüttung von antidiuretischem Hormon (ADH) und **(4)** einer adäquaten Antwort der Sammelrohrhauptzellen auf den genannten endokrinen Stimulus, also eine Steigerung der osmotischen Wasserpermeabilität des Sammelrohrs durch Einbau der luminalen Wasserkanäle Aquaporin 2 (AQP2) [14, 17, 26, 27].

Untersuchungen an neugeborenen Säugetieren rechtfertigen die verminderte Konzentrationskapazität einerseits mit einem unterentwickelten medullären osmotischen Gradienten [17, 26, 28], andererseits mit einer deutlich eingeschränkten Fähigkeit, die Wasserpermeabilität des Sammelrohrs nach ADH-Stimulation zu steigern [14, 27, 29].

1.4 Bedeutung der Kaliumleitfähigkeit für die Transportfunktion des distalen Konvoluts

Die Aufgabe des distalen Konvoluts besteht in der Aufnahme von Na^+ und in der endokrin gesteuerten Rückresorption von Ca^{2+} und Mg^{2+} (s. Kap. 1.2).

Während K^+ in sämtlichen Nephronabschnitten in mehr oder weniger großer Menge resorbiert oder sezerniert wird, ist der K^+ -Transport des DCT hinsichtlich des Netto-Transports marginal. Dennoch spielt der transmembranöse K^+ -Fluss eine entscheidende Rolle für die Gesamtfunktion der hochaktiven Tubuluszelle. Im DCT ist die K^+ -Leitfähigkeit äußerst hoch, so dass das Membranpotential der Zelle nahe dem Gleichgewichtspotential für K^+ bei ca. -90 mV liegt [30]. Die hohe K^+ -Leitfähigkeit liefert die Triebkraft für sämtliche elektrogene Transportvorgänge und ermöglicht das sog. „pump-leak-coupling“ [31], also das „Recycling“ von K^+ über die basolaterale Membran, um die Aktivität der eben dort lokalisierten Na^+/K^+ -ATPase sicherzustellen (s. Abb. 1.2).

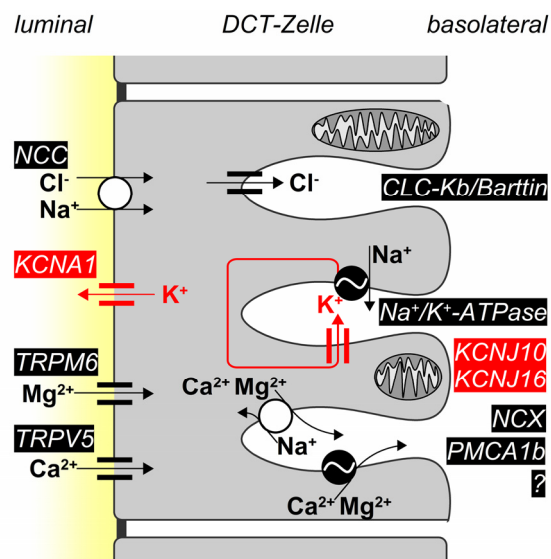


Abb. 1.2: Transportmodell für die Na^+ -, Cl^- -, Mg^{2+} - und Ca^{2+} -Resorption im distalen Konvolut (DCT).

Luminale und basolaterale K^+ -Kanäle bestimmen im Wesentlichen das Potential der DCT-Zelle. Luminal wird NaCl über den thiazidsensitiven NCC [32], Mg^{2+} über den TRPM6-Kanal und Ca^{2+} über den TRPV5-Kanal [4, 5, 33] in die Zelle aufgenommen. Basolateral werden Cl^- passiv über CLCKB/Barttin [34], Na^+ primär-aktiv über die Na^+/K^+ -ATPase, Ca^{2+} und vermutlich auch Mg^{2+} sekundär-aktiv über selektive Antiporter aus der Zelle heraustransportiert [4, 5, 34]. Große Mengen an luminal und basolateral aufgenommenem Na^+ müssen primär-aktiv exportiert werden, was die sehr hohe Dichte an Na^+/K^+ -ATPasen und Mitochondrien in diesem Nephronsegment erklärt. Der parazelluläre Weg ist vermutlich nur für kleine Anionen wie Cl^- permeabel (nicht dargestellt).

Mittels molekularbiologischer, immunhistochemischer und elektrophysiologischer Verfahren wurden zahlreiche K^+ -Kanäle im DCT identifiziert (s. Abb. 1.2 und Tab. 1.1).

Die luminal gelegenen Kanäle KCNJ1 (ROMK), KCNK1 (TWIK1) und KCNA1 (Kv1.1) repolarisieren die luminal Membran und steigern die Triebkraft der elektrogenen Ca^{2+} - und

Mg²⁺-Aufnahme über TRPV5 und TRPM6 [33, 35-37]. Unbeeinflusst davon bleibt die sekundär-aktive Na⁺-Resorption via NCC, da dieser Transporter elektroneutral arbeitet.

Am basolateralen Pol der mitochondrienreichen DCT-Zelle, deren Zelloberfläche durch die zahlreichen Invaginationen massiv vergrößert ist, werden KCNJ10 (Kir4.1), KCNJ15 (Kir4.2), KCNJ16 (Kir5.1) und KCNQ1 (KvLQT1) zahlreich exprimiert [38-42]. Diese Kanäle stabilisieren das Membranpotentials, gewährleisten das „pump-leak-coupling“ und unterstützen den basolateralen elektrogenen Cl⁻-Efflux.

Neben den bisher genannten Transportern sind einige weitere K⁺-Kanäle im DCT beschrieben (KCNJ6, KCNH6, KCNA7, KCNMA1), über deren Expression und Funktion noch Unklarheit herrscht.

Die Relevanz der K⁺-Kanäle im DCT wird anhand einiger nephrologischer Krankheitsbilder deutlich, die durch Mutationen der Kanal-codierenden Gene verursacht sind (s. Tab. 1.1 und Kap. 1.6, 1.7). Da die Niere meist nur einen von mehreren Expressionorten darstellt, beobachtet man häufig Kombinationen aus renalen und extrarenalen Symptomen, also Pleiotropie.

Kanal	Genloкус human	Lokalisation im DCT	Pathologie
KCNJ1 \triangleq ROMK	11q24-q25	luminal	Bartter-Syndrom Typ II (OMIM #241200)
KCNK1 \triangleq TWIK1	1q42-q43	luminal	
KCNA1 \triangleq Kv 1.1	12p13.32	luminal	dominant vererbte Hypomagnesiämie (OMIM *176260)
KCNJ10 \triangleq Kir4.1	1q22-q32	basolateral	EAST-Syndrom \triangleq SeSAME-Syndrom (OMIM #612780)
KCNJ15 \triangleq Kir4.2	21q22.2	basolateral	
KCNJ16 \triangleq Kir5.1	17q23.2-q24.2	basolateral	
KCNQ1 \triangleq KvLQT1	11p15.5	basolateral	Long-QT-Syndrom 1 (OMIM #192500), Hypokaliämie und Hypomagnesiämie, gastrointestinale Störungen
KCNJ6, KCNH6, KCNA7, KCNMA1	Kanäle mit unsicherer Expression und unbekannter Funktion.		

Tab. 1.1: Überblick über die Kalium-Kanäle des distalen Konvoluts (DCT). Die bisher identifizierten Kaliumkanäle mitsamt ihrem Genloкус beim Menschen und ihrer intrazellulären Lokalisation im DCT. Daneben Krankheitsbilder, die auf Mutationen dieser Kanäle beruhen.

Beispielsweise verursachen „loss-of-function“-Mutationen des KCNQ1 durch die Genexpression am Herzen das Long-QT-Syndrom Typ 1, welches eine myokardiale Repolarisationsstörung darstellt und zu vital bedrohlichen ventrikulären Tachyarrhythmien vom Typ „Torsade de Pointe“ führen kann. Die gleichzeitig auftretende renal bedingte Hypokaliämie und Hypomagnesiämie begünstigen die kardialen Ereignisse [41, 43]. Außerdem führen Mutationen des KCNQ1 zu gastrointestinalen Störungen, da dieser Kanal wesentlich an der Magensäuresekretion [44] und am Elektrolyttransport im Dünndarm beteiligt ist [41, 45].

1.5 KCNJ10 und KCNJ16 – Kaliumeinwärtsgleichrichter im basolateralen DCT

Die basolaterale K^+ -Leitfähigkeit im distalen Konvolut und im kortikalen Sammelrohr wird, zumindest bei der Maus, im Wesentlichen von den Kanälen KCNJ10 (Kir4.1) und KCNJ16 (Kir5.1) getragen [38, 40]. Beide Kanäle gehören zur Familie der einwärtsgerichtenden Kaliumkanäle, einer Klasse von K^+ -Kanälen, deren Untereinheiten strukturell durch zwei Transmembran-Helices und durch eine porenbildende Domäne (2TM-P) gekennzeichnet sind. Erst durch die Polymerisierung von vier Untereinheiten entstehen funktionstüchtige Kanäle, deren Leitfähigkeit entsprechend der namensgebenden biophysikalischen Eigenschaft, nämlich der „Einwärtsgleichrichtung“, bei Hyperpolarisation zunimmt [46].

Die Nomenklatur der Kaliumkanäle ist uneinheitlich. Einige Autoren bezeichnen das Gen eines einwärtsgerichtenden Kaliumkanals mit „KCNJ“, das zugehörige Protein mit „Kir“ [47]. Der Übersichtlichkeit wegen werden in dieser Arbeit sowohl Gen als auch Protein entsprechend der HUGO-Nomenklatur als „KCNJ“ deklariert. Die Bezeichnung „Kir“ nach der IUPHAR-Nomenklatur wird gelegentlich zur Orientierung in Klammern genannt.

1.5.1 Eigenschaften und Regulation von KCNJ10 und KCNJ16

KCNJ10, Genlokus 1q23-q32 (human), und KCNJ16, Genlokus 17q23.2-q24.2 (human), weisen das charakteristische Strukturmerkmal der Einwärtsgleichrichter auf: 2TM-P (s. Abb. 1.3). Trotz topologischer Ähnlichkeit bestehen einige funktionelle Unterschiede. Während KCNJ10 aktive Homomere bildet, sind KCNJ16-Homomere bis auf wenige Ausnahmen (s. Kap. 1.5.2)

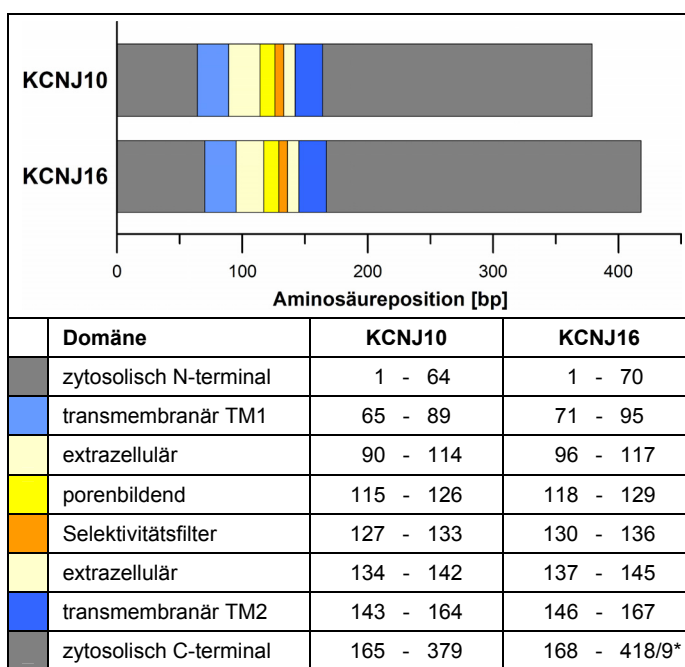


Abb. 1.3: Membrantopologie der Kaliumkanäle KCNJ10 (Kir4.1) und KCNJ16 (Kir5.1) bei Mensch und Maus. Abgebildet sind die humanen bzw. murinen Kaliumkanäle KCNJ10 und KCNJ16, genauer deren Untereinheiten. Für funktionelle Kanäle lagern sich je vier dieser Untereinheiten zu Homotetrameren (4x KCNJ10) oder Heterotetrameren (2x KCNJ10 + 2x KCNJ16) zusammen.

Da sich die Topologie zwischen Mensch und Maus gar nicht (für KCNJ10) oder nur minimal (für KCNJ16 nur in der Länge der C-terminalen zytosolischen Domäne, s. *: human 418, murin 419) unterscheidet, ist je ein gemeinsames Modell dargestellt.

[aus SwissProt: hKCNJ10: P78508, hKCNJ16: Q9NPI9, mKCNJ10: Q9JM63, mKCNJ16: Q9Z307].

inaktiv [48-50]. In der Niere und einigen anderen Organen entstehen durch Interaktion von je zwei KCNJ10- und KCNJ16-Untereinheiten funktionelle Heteromere, die sich in einigen biophysikalischen Eigenschaften von den Homomeren abgrenzen [38, 48, 51-54].

Das Homotetramer KCNJ10 besitzt eine hohe Offenwahrscheinlichkeit von 0,8 - 0,9 und eine mittlere Leitfähigkeit von 20 - 30 pS. Durch die Heteromerisierung mit KCNJ16 halbiert sich die Offenwahrscheinlichkeit, während sich die Leitfähigkeit in etwa verdoppelt [38, 40, 53]. Der Einzelkanalstrom des KCNJ10 zeigt lange „Bursts“ mit kurzen Pausen, KCNJ10/KCNJ16 hingegen nur vereinzelte „Bursts“ mit langen Pausen [40, 53].

Darüber hinaus verstärkt die Heteromerbildung die Gleichwärtseinrichtung [48, 51, 54] und verändert die pH-Sensitivität [38, 51-53, 55]. Die Aktivität des homomeren KCNJ10 ist durch eine sigmoidale, spannungsunabhängige pH-Abhängigkeit mit einer IC_{50} (Protonenkonzentration, bei der die halbmaximale Kanalaktivität erreicht wird) von 6,0 - 6,4 gekennzeichnet. Intrazelluläre Azidifizierung verringert, Alkalisierung erhöht die Offenwahrscheinlichkeit. Die Einzelkanalamplitude bleibt davon unbeeinflusst [38, 40, 52, 53]. Durch Interaktion von KCNJ10 und KCNJ16 wird die pH-Sensitivität um ein bis zwei pH-Einheiten auf eine IC_{50} von 7,2 - 7,45 angehoben, also in den physiologischen Bereich verschoben [38, 40, 52, 53, 55]. Die Hemmung von KCNJ10 durch CO_2 im Rahmen der zentralen Atemregulation im Hirnstamm kommt vermutlich indirekt durch die intrazelluläre Ansäuerung zustande [53].

Aktivierende Wirkung auf KCNJ10 und KCNJ10/KCNJ16 wird dem Phosphatidylinositol-bisphosphat (PIP_2) zugesprochen, das nach Bindung an die zytosolische Domäne des Kanals eine Konformationsänderung der Transmembrandomänen induziert und die Aneinanderlagerung der Kanaluntereinheiten beeinflusst [53, 55, 56].

Einige biogene Polyamine (Spermin, Spermidin, Putrescin) sowie Mg^{2+} führen zu einer spannungsabhängigen Kanalblockade. Diese Substanzen verstärken die Einwärtsgleichrichtung [38, 40]. Inhibitorisch wirkt auch die Phosphorylierung durch die Proteinkinase C (PKC), welche in vitro direkt über PKC-Aktivatoren (z.B. Phorbol ester, Tymeleatoxin) oder durch G-Proteingekoppelte Signaltransduktion aktiviert wird [57, 58]. Daher ist von einer (neuro)-endokrinen Regulationsmöglichkeit der Kanäle in vivo auszugehen.

1.5.2 Organspezifische Expression und Funktion von KCNJ10 und KCNJ16

Das Expressionsprofil der humanen und murinen Kaliumkanäle KCNJ10 und KCNJ16 (s. Abb. 1.4) zeigt, dass sich die Organexpression der beiden Kanäle nur partiell überlappt und dass es daher neben der Heteromerbildung mit KCNJ10 weitere Mechanismen geben muss, die dem KCNJ16 zur Funktion verhelfen. Durch Coexpression von KCNJ16 und dem Einwärtsgleichrichter KCNJ15 (Kir4.2) entstehen in einigen Geweben, z.B. in Niere oder Pankreas, aktive Kaliumkanäle [52, 59]. Speziell im zentralen Nervensystem sollen „Gerüstproteine“ aus der

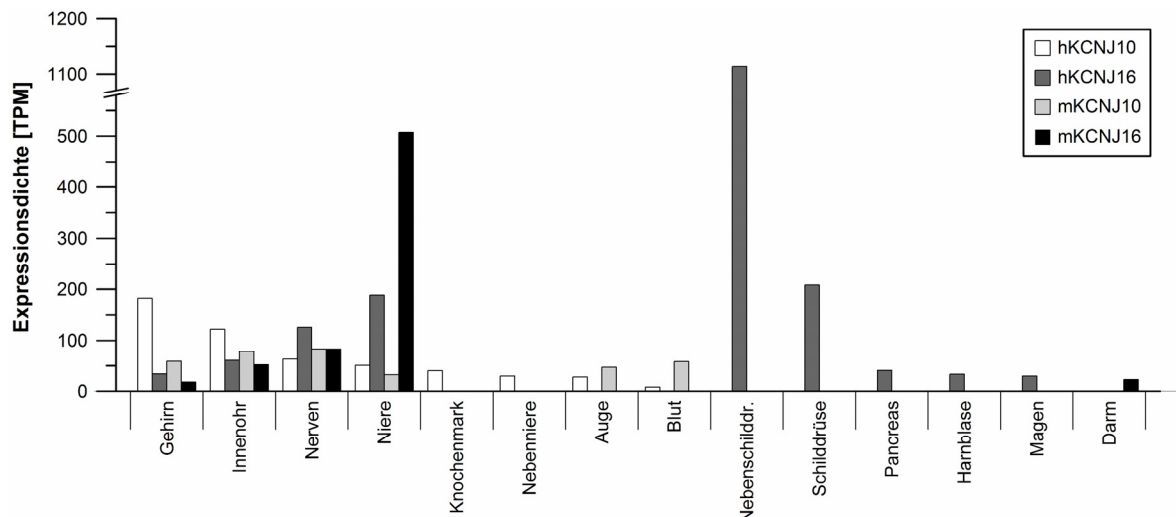


Abb. 1.4: Organspezifisches mRNA-Expressionsmuster des humanen und murinen KCNJ10 und KCNJ16 (Auswahl). Verteilung und Expressionsdichte der Kaliumkanäle KCNJ10 und KCNJ16 in Mensch und Maus, ermittelt durch die Expressed Sequence Tag (EST)-Analyse, ein quantitatives molekularbiologisches Verfahren. TPM: Transcripts per million. [Expressionsdaten entsprechend NCBI UniGene EST Profiles: hKCNJ10: Hs.408960, hKCNJ16: Hs.463985, mKCNJ10: Mm.254563, mKCNJ16 Mm.30176].

Familie der MAGUKs (membrane associated guanylate kinase homologues), z.B. PSD-95, das Targeting und die Membranexpression von KCNJ16 unterstützen [50].

Gehirn. Im Gehirn werden KCNJ10 und KCNJ16 hauptsächlich in Gliazellen, aber auch in einigen Neuronen exprimiert. Die Kaliumkanäle der Glia puffern das extrazelluläre K^+ , stabilisieren das perineurale Milieu und schaffen damit eine notwendige Voraussetzung für die neuronale Erregbarkeit [60]. Ausserdem beeinflussen sie komplexe zelluläre Mechanismen, wie Proliferation, Differenzierung, Myelinisierung und Signaltransduktion [61-63]. Im Hirnstamm tragen KCNJ10 und KCNJ16 maßgeblich zur zentralen Chemorezeption und folglich zur Kreislauf- und Atemregulation bei [53, 58].

Auge. In der Glia der Retina, den sog. Müllerzellen, wird die K^+ -Leitfähigkeit primär durch KCNJ10 (in den Endfüßen) und KCNJ10/KCNJ16 (im Zellsoma) getragen [64, 65]. Die Kanäle gewährleisten die extrazelluläre K^+ -Homöostase und sind am Aufbau des retinalen Feldpotentials sowie am strukturellen Erhalt der komplexen Netzhautschichtung beteiligt [66].

Innenohr. Die Signaltransduktion am Cortiorgan setzt einen hohen K^+ -Gehalt der Endolymphe und ein positives endocochleäres Potential voraus. Beides wird in einem komplexen Zusammenspiel unterschiedlicher Zelltypen der Stria vascularis generiert, wobei die dafür notwendige K^+ -Leitfähigkeit wesentlich von KCNJ10 mitgetragen wird. Außerdem ist KCNJ10 für die Trophik der Neurone im Ganglion spirale und vestibulare von Bedeutung. Somit beeinflusst dieser K^+ -Kanal neben dem Hören vermutlich auch den Gleichgewichtssinn [67, 68].

Niere. Ein hohes Expressionslevel von KCNJ10 und KCNJ16 ist in der basolateralen Membran des Nierenepithels nachweisbar: hauptsächlich im DCT, mittelgradig in den Hauptzellen des kortikalen Sammelrohrs und nur schwach in der TAL [39]. Expressionsanalysen und funktionelle Untersuchungen belegen, dass *erstens* nicht das Homomer KCNJ10, sondern das Heteromer KCNJ10/KCNJ16 die hauptsächliche Erscheinungsform darstellt, und dass *zweitens* das Heteromer den wichtigsten basolateralen K^+ -Kanal des DCT und des kortikalen Sammelrohrs verkörpert [38, 40]. Das Aufgabenspektrum von KCNJ10/KCNJ16 umfasst die Stabilisierung des Membranpotentials und das basolaterale K^+ -Recycling („pump-leak-coupling“) [31], sowie das „fine tuning“ der Mg^{2+} - und Ca^{2+} -Resorption im DCT. Zudem hat das Heteromer wegen seiner pH-Sensitivität im physiologischen Bereich Einfluss auf die systemische pH-Balance [51-53]: Azidose hemmt den Kaliumkanal, vermindert die Na^+/K^+ -ATPase-Aktivität und damit die luminalen Na^+ -Resorption; erhöhtes luminales Na^+ im Sammelrohr stimuliert die H^+ - und K^+ -Sekretion. Bei Alkalose laufen diese Prozesse entgegengesetzt ab.

Magen. Im Magen soll KCNJ10 neben den Kaliumkanälen KCNE2/KCNQ1 für die Säureproduktion der Parietalzellen von Bedeutung sein (obwohl nicht im mRNA-Expressionsprofil aufgeführt) [44, 45].

Gemäß dem Expressionsprofil (s. Abb. 1.4) wird KCNJ16 in der humanen Nebenschilddrüse stark exprimiert. Einschlägige Forschungsarbeiten existieren hierzu bisher nicht. Für KCNJ10 ist eine Interaktion mit dem Calcium-Sensing-Receptor (CaSR) im DCT beschrieben: CaSR soll dort den K^+ -Kanal hemmen und so indirekt den Salztransport regulieren [69]. Eventuell interagieren KCNJ16 bzw. KCNJ10/KCNJ16 in der Nebenschilddrüse ebenso wie im DCT mit dem CaSR, der bekanntermaßen in diesem Organ massiv exprimiert wird und in Abhängigkeit vom Serum- Ca^{2+} die Parathormon-Sekretion steuert.

1.5.3 KCNJ10-Knockout-Maus und ihr ZNS-Phänotyp

Aufgrund der essentiellen Funktion des Kaliumkanals KCNJ10 im Nervensystem führt dessen Verlust in der Knockout-Maus zu gravierenden neurologischen Symptomen, wie Ataxie, Epilepsie und Paralyse. Morphologisch lassen sich teils massive substantielle Defekte in Gehirn und Rückenmark nachweisen. Infolge dieser Pathologien kommt es zu schweren Reifungsstörungen und zum verfrühten Tod der Knockout-Tiere binnen der ersten Lebenswochen [61, 66, 70]. Im Innenohr macht sich der fehlende Kanal durch ein defizitäres endocochleäres Potential und durch neurodegenerative Vorgänge in Ganglion spirale und spinale bemerkbar, was zu sensorineuraler Taubheit und möglicherweise auch zu Gleichgewichtsstörungen führt [67, 68]. Die Retina der Knockouts zeigt funktionelle und morphologische Störungen [66].

1.6 Hereditäre hypokaliämische Salzverlust-Tubulopathien

Hypokaliämische Salzverlustsyndrome, auch als Bartter-Syndrome (BS) und Gitelman-Syndrom (GS) bekannt, subsumieren eine klinisch und genetisch heterogene Gruppe autosomal-rezessiver Erbkrankheiten. Allen gemein ist der Defekt eines Gens, dessen Produkt essenziell für den NaCl-Transport in der TAL oder im DCT ist. Aus der gestörten NaCl-Resorption resultieren die charakteristischen Symptome: Hypokaliämie, metabolische Alkalose, Normo- oder Hypotension und sekundärer hyperreninämischer Hyperaldosteronismus einhergehend mit Hyperplasie des juxtaglomerulären Apparats [71, 73-75]. Das klinische Bild variiert in Abhängigkeit des zugrunde liegenden genetischen Defekts, so dass eine Einteilung der Salzverlustsyndrome sowohl aufgrund klinischer als auch aufgrund molekularbiologischer Aspekte getroffen wurde (s. Tab. 1.2) [71-73].

1.6.1 Antenatales Bartter-Syndrom (BS Typ I und II)

Das antenatale Bartter-Syndrom, bedingt durch einen Defekt des NKCC2 (BS Typ I) oder des ROMK (BS Typ 2), beschreibt ein potentiell lebensbedrohliches Krankheitsbild, das sich in 90% der Fälle bereits in utero manifestiert: Die fetale Polyurie führt gegen Ende des zweiten Trimenons zur Ausbildung eines Polyhydramnions, später zur Frühgeburtlichkeit [71, 73, 76, 77].

Post partum zeigt sich ein ausgeprägter Salzverlust, eine massive Polyurie und Polydipsie, die mit

	Antenatales Bartter-Syndrom		Klassisches Bartter-Syndrom	Bartter-Syndrom mit sensorineuraler Taubheit	Gitelman-Syndrom
	BS Typ I	BS Typ II	BS Typ III	BS Typ IV	
Genlokus	15q15-21	11q24-25	1p36	1p31	16q13
Gen	SLC12A1	KCNJ1	CLCNKB	BSND	SLC12A3
Genprodukt	NKCC2	ROMK	ClC-Kb	Barttin	NCC
Polyhydramnion	+	+	–	+	–
Gedeihstörung	+	+	+ / –	++	–
Polyurie + Polydipsie	+	+	+ / –	++	+ / –
Muskelkrämpfe	–	–	–	+ / –	++
Innenohrschwerhörigkeit	–	–	–	+	–
Chondrocalcinose	–	–	–	–	++
Serum-K ⁺	↓	↓	↓	↓	↓
Metabolische Alkalose	+	+	+	+	+
Serum-Mg ²⁺	↓ / normal	↓	↓ in 20%	normal	↓ in 100%
Urin-Ca ²⁺	↑↑↑	↑↑↑	normal / ↑	normal	↓
Urin-PGE ₂	↑↑↑	↑↑↑	↑	↑↑↑	Normal
Renin, Aldosteron	↑	↑	↑	↑	Normal / ↑

Tab.1.2: Klinische, laborchemische und molekularbiologische Merkmale der hereditären hypokaliämischen Salzverlusttubulopathien Bartter-Syndrome und Gitelman-Syndrom [71-73].

einer vital bedrohlichen Dehydration einhergehen können. Bei vielen Patienten wird ein erhöhtes Prostaglandin PGE_2 in Urin und Serum gemessen, das seinerseits Fieber, Polyurie, Erbrechen und Diarrhoe induziert und zu der synonymen Bezeichnung dieses Krankheitsbildes „Prostaglandin-E-Syndrom“ führte [71, 73, 78, 79]. Nicht adäquat behandelte Kinder sind geistig und körperlich retardiert, einige entwickeln eine terminale Niereninsuffizienz [72, 73].

1.6.2 Klassisches Bartter-Syndrom (BS Typ III)

Ursache des klassischen Bartter-Syndroms sind Mutationen in *CLCNKB*, dessen Genprodukt der Cl^- -Kanal ClC-Kb ist. Letzterer wird unter anderem am basolateralen Zellpol der TAL und des DCT exprimiert. Klinisch auffällig werden die Betroffenen im Säuglings- oder Kleinkindalter durch Polyurie und Polydipsie, häufiges Erbrechen und Diarrhoe sowie Gedeihstörung [71, 73]. Verglichen mit dem antenatalen BS verläuft das klassische BS deutlich milder, was auf die Existenz und kompensatorische Funktion eines weiteren basolateralen Cl -Kanals (ClC-Ka) und eines KCl -Symportsystems in der TAL zurückzuführen ist [71].

1.6.3 Bartter-Syndrom mit sensorineuraler Taubheit (BS Typ IV)

Eine eigene Entität unter den antenatalen Tubulopathien stellt das Bartter-Syndrom mit sensorineuraler Taubheit dar, das unter allen BS die schwerwiegendste Klinik zeigt [73, 80]. Das mutierte Gen *BSND* codiert für Barttin, die β -Untereinheit der Cl^- -Kanäle ClC-Ka und ClC-Kb , die in der TAL, im DCT und in der Stria vascularis des Innenohrs exprimiert werden. Das intakte Barttin bzw. ClC-Ka und ClC-Kb gewährleisten in der Stria vascularis die hohe basolaterale Cl^- -Leitfähigkeit der Marginalzellen. Dies ermöglicht die Produktion der K^+ -reichen Endolymphe und die Ausbildung eines positiven endocochleären Potentials – beides fundamentale Voraussetzungen für die mechano-chemo-elektrische Signaltransduktion des Cortiorgans [73].

1.6.4 Gitelman-Syndrom (GS)

Das Gitelman-Syndrom wird durch verschiedene „loss-of-function“-Mutationen des NaCl -Cotransporters *NCC* verursacht und repräsentiert die mildeste Form der hier beschriebenen Salzverlustsyndrome. Unterschiede im Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Haushalt ermöglichen die Differenzierung zwischen GS und den BS: Bei ansonsten ähnlichen laborchemischen Befunden (s. Tab. 1.2) sind Hypocalciurie und Hypomagnesiämie spezifisch für das GS. Ursache der Hypocalciurie bei Normocalciämie ist nicht nur, wie lange Zeit angenommen, eine vermehrte aktive Ca^{2+} -Resorption im späten DCT, sondern vielmehr eine verstärkte passive Ca^{2+} -Aufnahme im proximalen Tubulus, angetrieben durch eine kompensatorische Steigerung der proximalen Na^+ -Resorption in Folge von Hypovolämie [4, 73, 81]. Die Hypomagnesiämie soll durch eine Umstrukturierung des Epithels im frühen DCT entstehen, speziell durch die „Down-Regulation“ des luminalen Mg^{2+} -Kanals *TRPM6* [4, 81]. Klinisch manifestiert sich das GS im Jugend- oder

Erwachsenenalter durch variable Symptome, wie rasche Ermüdbarkeit, Schwindel, Obstipation, Muskelschwäche und Tetanie [71, 73]. Mehr als 50% der Betroffenen leiden unter Gelenkschmerzen infolge einer Chondrocalcinose [73]. Auch EKG-Veränderungen im Sinne einer QT-Verlängerung wurden bei 40% der Patienten beobachtet [82]. Die klassischen Symptome der BS, wie Salzverlust, Polyurie und Polydipsie, sind nicht oder nur minimal ausgeprägt [73].

Dank weiterer klinischer und experimenteller Studien wird die Subspezifizierung der Bartter-ähnlichen Salzverlustsyndrome in den nächsten Jahren fortschreiten. Einige Autoren beschreiben bereits das *Bartter-Syndrom Typ V* als Folge einer „gain-of-function“-Mutation des im DCT gelegenen Calcium-Sensing-Receptors CaSR [73, 83, 84]. Auch Gene und Genprodukte, die zunächst keinen offensichtlichen Zusammenhang mit dem Elektrolyttransport haben, werden bei der Pathogenese von Salzverlustsyndromen diskutiert. So sollen Mutationen der Kinase-Subfamilie WNK (with no K (Lysin)) Tubulopathien bedingen [71].

1.7 EAST/SeSAME – eine „neue“ und seltene Tubulopathie

Unlängst haben zwei Forschergruppen (Robert Kleta et al. [85] / Rick Lifton et al. [86]) unabhängig voneinander ein neues Krankheitsbild entdeckt, welches im Zusammenhang mit mehreren „loss-of-function“-Mutationen des KCNJ10 steht und die Liste der hereditären Salzverlustsyndrome erweitert. Entsprechend den Leitsymptomen wird das Krankheitsbild als EAST-Syndrom (*epilepsy, ataxia, sensorineural deafness, tubulopathy*) [85] oder SeSAME-Syndrom (*seizures, sensorineural deafness, ataxia, mental retardation, electrolyte imbalance*) [86] bezeichnet. Seit der Erstbeschreibung des Syndroms in 2009 mit insgesamt sieben Mutationen wurden bis dato (Ende 2013) mindestens sieben weitere Mutationen identifiziert [87-90].

Aufmerksam auf den neurologisch-renalen Symptomenkomplex und dessen potentiell genetische Ursache wurde man durch die systematische Analyse mehrerer (meist) konsanguiner Stammbäume aus unterschiedlichen Ethnien (Kleta: pakistanisch, arabisch, algerisch, indisch, iranisch, afroamerikanisch / Lifton: kanadisch, britisch, türkisch, afghanisch, somalisch).

1.7.1 Klinischer Befund – neurologische und renale Funktionsstörungen

Alle bisher diagnostizierten Fälle präsentieren unabhängig von der zugrunde liegenden Mutation ein relativ uniformes klinisches Bild: Die Betroffenen fielen bereits als Säuglinge durch generalisierte tonisch-klonische Krampfanfälle und eine drastische motorische und kognitive Retardierung auf. Hinzu kamen Symptome ähnlich einer cerebellären Dysfunktion, i.e. Gangataxie, Intentionstremor, Dysdiadochokinese; ferner eine Innenohrschwerhörigkeit mit Hörver-

lusten bis 50 dB. Während die apparative neurologische Diagnostik bei R. Kleta et al. unauffällig war, sind bei R. Lifton et al. eine reduzierte Nervenleitgeschwindigkeit und Hypomyelinisierung der peripheren Nervenfasern sowie zwei Fälle mit Kleinhirnatrophie beschrieben. Die renale Komponente des EAST/SeSAME-Syndroms manifestiert sich als eine komplexe Störung des Elektrolythaushalts: Hypokaliämie und metabolische Alkalose, Hypomagnesiämie und Hypocalciurie, sekundärer hyperreninämischer Hyperaldosteronismus infolge des Na^+ -Verlusts, dazu Hypo- oder Normotension (s. Abb. 1.5 A).

1.7.2 Genetischer Aspekt – autosomal-rezessiver Erbgang und „loss-of-function“ des KCNJ10

Konsanguinität und die Verteilung der Phänotypen innerhalb der jeweiligen Stammbäume lassen einen autosomal-rezessiven Erbgang vermuten (s. Abb. 1.5 B).

Mittels genomweiter Linkage-Analysen der betroffenen Kinder und deren klinisch unauffälligen Eltern identifizierte man eine einzige relevante Region auf Chromosom 1, welche mehrere Dutzend bekannter Gene einschließlich KCNJ10 umfasst [85, 86]. Aufgrund der Analogien zwischen EAST/SeSAME-Patienten und dem ZNS-Phänotyp der KCNJ10-Knockout-Maus (s. Kap. 1.5.3) konzentrierten sich weitere Forschungen auf das KCNJ10-Gen. Die direkte Sequenzierung der codierenden Sequenz des KCNJ10-Gens deckte bisher 14 verschiedene Missense-, Nonsense- oder Frameshift-Mutationen auf, die bei den Betroffenen als homozygoter oder compound-heterozygoter Genotyp vorlagen (s. Abb. 1.5 C). Spezies-übergreifende Homologie-Analysen des Proteins KCNJ10 wiesen die von der Mutation betroffenen Aminosäuren als hoch konserviert und höchstwahrscheinlich funktionell bedeutsam aus [85, 88-91].

1.7.3 Funktionelle Analysen – genmanipulierte Tiermodelle und heterologe Expressionssysteme

Um die biologische Relevanz des KCNJ10 und dessen Mutanten zu überprüfen, wurden die entsprechenden Kanäle an genmanipulierten Tiermodellen und in heterologen Expressionssystemen untersucht.

Der schon seit Längerem beschriebene ZNS-Phänotyp der KCNJ10-Knockout-Maus (s. Kap. 1.5.3) entspricht im Wesentlichen den neurologischen Symptomen der EAST/SeSAME-Patienten. Der signifikante Überlebensunterschied zwischen dem kompletten Knockout und dem isolierten ZNS-Knockout, also 8 Tage versus 3 - 4 Wochen [70, 85], hebt den aggravierenden Effekt des renalen Salzverlusts hervor.

Die elektrophysiologische Evaluation einiger KCNJ10-Mutanten wurde initial von R. Kleta et al. in Angriff genommen, wozu unsere Arbeitsgruppe als Kooperationspartner entscheidend beitrug. Ein Teil dieser Daten wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhoben.

Die Schwere und Vielschichtigkeit des EAST/SeSAME-Syndroms sowie der Phänotyp der KCNJ10-Knockout-Maus demonstrieren die Bedeutsamkeit des einwärtsgerichteten Kaliumkanals KCNJ10. Die renale Symptomatik, ein Salzverlustsyndrom ähnlich dem Gitelman-Syndrom, unterstreicht die Funktion des distalen Konvoluts und bestätigt das von H.H. Ussing etablierte Konzept der funktionellen Kopplung von Na^+/K^+ -ATPase und Na^+ - bzw. K^+ -Leitfähigkeit in transportierenden Epithelien („pump-leak-coupling“) [31].

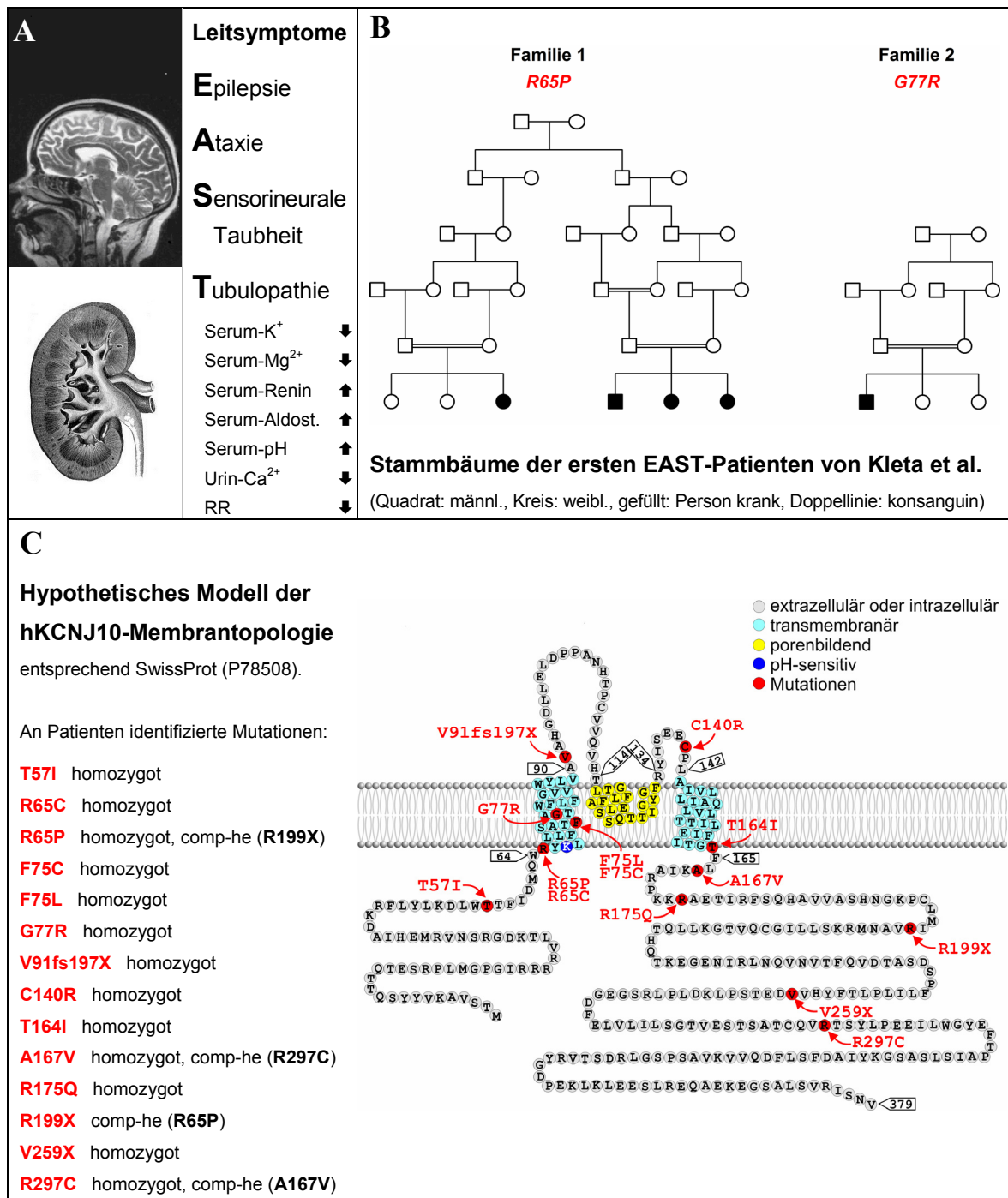


Abb. 1.5: Überblick EAST/SeSAME-Syndrom [85-90]. A Klinische Leitsymptome. B Formale Genetik: autosomal-rezessiver Erbgang und Konsanguinität. C hKCNJ10-Membrantopologie. Aminosäurereste mit spezifischen Funktionen sind farbig markiert. Die bei EAST/SeSAME-Patienten identifizierten Mutationen sind rot hervorgehoben. (comp-he: compound-heterozygot).

2 Zielsetzung

2.1 Postnatale Nierenentwicklung

Ein Großteil der gegenwärtigen Forschungsarbeiten auf dem Gebiet der Nierenphysiologie und Nierenpathophysiologie wird an genveränderten Labortieren betrieben. Abgesehen von Nicht-Säugetieren sind nahezu alle Technologien zur Veränderung des tierischen Erbguts, z.B. das Gen-Knockout, ausschließlich in der Spezies Maus etabliert [92]. Allerdings waren es Ratten und andere größere Säuger, an denen man im letzten Jahrhundert viele richtungsweisende Erkenntnisse in der Nierenphysiologie, speziell zur ontogenetischen Entwicklung der Nierenfunktion, gewonnen hat. Daher liegen für die Spezies Maus derzeit nur wenige repräsentative Daten vor, die als Referenzwerte für laufende Forschungen an murinen Neonaten und Jungtieren herangezogen werden können.

Um die im Rahmen dieser Arbeit und die in Zukunft erhobenen Befunde zur renalen Ausscheidung von heranwachsenden und adulten Mäusen adäquat zu interpretieren, studierte ich die postnatale Nierenentwicklung in C57BL6-Wildtyp-Mäusen während der ersten drei Lebensmonate. Ein besonderes Augenmerk lag auf der renalen Wasser- und Elektrolythomöostase, auf der morphologischen Nierenentwicklung sowie auf der Expression wichtiger Transportproteine des distalen Nephrons, im Einzelnen NKCC2, NCC, AQP2, KCNJ10 und KCNJ16.

2.2 Warum verursachen Mutationen des KCNJ10 ein Salzverlustsyndrom?

Zahlreiche Erkrankungen der Niere beruhen auf einer genetisch bedingten Dysfunktion unterschiedlicher Transportproteine des Nierenepithels (s. Kap. 1.6), so auch die erst kürzlich entdeckte monogenetische Salzverlusttubulopathie EAST (*epilepsia, ataxia, sensorineural deafness and tubulopathy*) [85] bzw. SeSAME (*seizures, sensorineural deafness, mental retardation, and electrolyte imbalance*) [86]. Der hier zugrunde liegende Defekt ist bedingt durch mehrere Mutationen des Gens KCNJ10, das für einen einwärtsgerichtenden Kaliumkanal kodiert. Der Kanal KCNJ10 (Kir4.1) wird in der Niere vor allem im distalen Konvolut expri-

miert, wo er vermutlich als Heteromer mit KCNJ16 (Kir5.1) die basolaterale Kaliumleitfähigkeit sicherstellt [38, 40, 48, 51].

Um die funktionelle Relevanz der EAST/SeSAME-Mutationen zu evaluieren, führten wir verschiedene In-vivo- und In-vitro-Analysen durch.

Im Rahmen der In-vivo-Experimente wurde der renale Phänotyp der KCNJ10-Knockout-Maus untersucht, insbesondere das Körperwachstum und die renale Elektrolyt- und Wasserausscheidung. Damit wurde der bereits beschriebene ZNS-Phänotyp der KCNJ10-Knockout-Maus (s. Kap. 1.5.3) um die renale Komponente ergänzt.

Des Weiteren fertigten wir immunhistologische Färbungen von Nieren heranwachsender Wildtyp- und KCNJ10-Knockout-Mäusen an, um Kenntnis über das entwicklungsabhängige Expressionsmuster dieser Kanäle zu erlangen und um den Einfluss des defekten KCNJ10 auf das Wachstum und die Morphologie der Niere abzuschätzen.

Die In-vitro-Experimente konzentrierten sich auf die elektrophysiologische Charakterisierung der EAST/SeSAME-Missense-Mutation c.G194C (entspricht p.R65P, kurz R65P). Dazu wurde das mutierte Gen in heterologen Systemen (CHO- und HEK293-Zellen) exprimiert und anschließend mittels Patch-Clamp-Technik analysiert. Da KCNJ10 in der Niere vorrangig als Heteromer KCNJ10/KCNJ16 funktionelle Kanäle bilden soll, untersuchten wir auch die elektrophysiologischen Eigenschaften der entsprechenden Heteromere, um die In-vivo-Verhältnisse möglichst getreu abzubilden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Gerät	Modell, Hersteller
Atomabsorptionsspektrometer	Solaar M5, Thermo Electron, Karlsruhe, D
Autoklav	Tuttnauer 2540ELC, biomedis GmbH, Gießen, D
Brutschrank	Heraeus Instruments, Osterode, D
Bunsenbrenner	Modell C206D, Campinggaz, Saint-Denis, F
Chirurgische Instrumente	FST, Bad Oeynhausen, D
Elektrophoresekammer, horizontal	Harnischmacher, Kassel, D
EPC-10 Patch-Clamp Verstärker	HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht, D
EPC-7 ähnlicher Patch-Clamp Verstärker	U. Fröbe, Freiburg, D
Gasmischanlage für Isofluran-Verdampfer	MFI Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim, D
Invertmikroskop Axio Imager M1	Carl Zeiss AG, Jena, D
Invertmikroskop Axiovert 10	Carl Zeiss AG, Jena, D
Invertmikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss AG, Jena, D
Invertmikroskop Axiovert 200M	Carl Zeiss AG, Jena, D
Kamera AxioCamHR (Typ c)	Carl Zeiss AG, Jena, D
Kamera AxioCamMR3 (Typ 4105)	Carl Zeiss AG, Jena, D
Kamera Coolsnap HQ	Roper Scientific, Trenton, NJ, USA
Manueller Perfusor	Eigenbau C. Sterner, Universität Regensburg, D
Mikrotom, Kryostat-Mikrotom	CM3050 S, Leica, Wetzlar, D
Mikrotom, Rotations-Mikrotom	RM2165, Leica, Wetzlar, D
PCR-Gerät Thermocycler	TProfessional, Biometra, Göttingen, D
pH-Meter	Schott AG, Mainz, D
Pipetten-Ziehgerät (Puller)	Zeitz, Augsburg, D
Plattenlesegerät	Sunrise, Tecan Group Ltd., Männedorf, CH
PowerLab (Aufzeichnung Patch-Clamp)	Modell 4/30, AD Instruments, AUS
Rollerpumpe	Ismatec SA., Zürich, CH
Schüttelinkubator	Gallenkamp, GB
Stereo-Mikroskop (OP-Set Up)	Stemi SV6, Zeiss, Jena, D
Sterilbank	LaminAir 1.2, Holten, Allerød, DK
Thermomixer	Modell 5436, Eppendorf AG, Hamburg, D
UV-Photospektrometer	Genova, Jenway, Essex, GB
Verdampfer für Narkosegas	Vapor 19.3, Drägerwerk AG, Lübeck, D
Vortexer	Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA
Waage, Analysenwaage	GR-120, A&D Weighing, Milpitas, CA, USA
Waage, Präzisionswaage	EK-600H, A&D Weighing, Milpitas, CA, USA
Wärmeplatte (OP-Set Up)	Dr. J. Barhanin, Nizza, F
Wasserbad	Modell W6, Prüfgeräte – Werk Medingen, Freital, D
Zentrifuge, Kühlzentrifuge	ZK 364, Hermle, Wehingen, D
Zentrifuge, Tischzentrifuge	Mikro 20, Hettich, Tuttlingen, D

3.1.2 Verbrauchsmaterial

Produkt	Modell, Hersteller
Deckgläschen rechteckig	Marienfeld, Lauda-Königshofen, D
Deckgläschen rund	Assistent, Sondheim, D
Dynabeads® FlowComp™ Human CD8	Gibco Cell Culture Systems – Invitrogen, Karlsruhe, D
Einbettkassetten	Labonord, Mönchengladbach, D
Einbettmedium Tissue-Tek®	Sakura Finetek Europe B.V. Zoeterwoude, NL
Glaskapillaren aus Borosilikat	Clark, Pangbourne, USA????
Insulinspritzen 0,5ml	Micro-Fine, BD Consumer Healthcare, Heidelberg, D
Mounting Medium DePex	Serva, Heidelberg, D
Mounting Medium Glycergel®	Dako, Hamburg, D
Objektträger Polylysin-beschichtet	Kindler, Freiburg, D
Objektträger Superfrost® Plus	Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig, D
PE-Schläuche (für Perfusionskatheter)	Benno Kummer, Freiburg, D
Petrischalen	Nuclon Surface, Nunc A/S, Roskilde, DK
Mäusefutter	SSNIFF Spezialdiäten GmbH, Soest, D

3.1.3 Chemikalien, Enzyme, Kits

Produkt	Hersteller
2-Methylbutan	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe, D
Agar	AppliChem, Darmstadt, D
Agarose	AppliChem, Darmstadt, D
Alkalische Phosphatase (10.000U/ml)	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Ammoniumacetat C ₂ H ₇ NO ₂	Merck, Darmstadt, D
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Aqua ad injectabilia	Braun, Melsungen, D
ATP (Dinatriumsalz)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
BaCl ₂ *2H ₂ O	Merck, Darmstadt, D
Bovines Albumin (Fraction V, 7,5%)	Gibco Cell Culture Systems – Invitrogen, Karlsruhe, D
Bovines Fibronectin	Biochrom AG, Berlin, D
BSA (bovine serum albumin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
CaCl ₂	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe, D
cDNA panel	Clone tech
Collagen from calf skin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
DMSO	Merck, Darmstadt, D
dNTP Mix	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
DPBS	Gibco Cell Culture Systems – Invitrogen, Karlsruhe, D
EDTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Eosin	Merck, Darmstadt, D
Essigsäure (Eisessig)	Merck, Darmstadt, D
Ethanol	J. T. Baker, Deventer, NL
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe, D
F-12 Nutrient Mixture (Ham)	Gibco Cell Culture Systems – Invitrogen, Karlsruhe, D
FCS (fetal calf serum)	Gibco Cell Culture Systems – Invitrogen, Karlsruhe, D
Gene Ruler (1kb-Marker + Loading Dye)	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Glucose	Merck, Darmstadt, D
Glucuronsäure-Calciumsalz	Carl Roth, Karlsruhe, D
Hefeextrakt, Bacto Yeast Extract	BD, Franklin Lakes, NJ, USA

Heparin-Lösung	Liquemin N 25000, 5ml, Roche, Mannheim, D
HEPES	AppliChem, Darmstadt
High Fidelity PCR Enzyme Kit	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Isofluran	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, D
Isopropanol	Merck, Darmstadt, D
K ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt, D
KCl	Merck, Darmstadt, D
Ketamin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
K-Gluconat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
KH ₂ PO ₄ *H ₂ O	Merck, Darmstadt, D
Kreatininstandard	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
L-Glutamin, 200 mM (100x), Flüssig	Gibco Cell Culture Systems – Invitrogen, Karlsruhe, D
Lipofectamine™ 2000	Gibco Cell Culture Systems – Invitrogen, Karlsruhe, D
Mayer's Hämalun	Merck, Darmstadt, D
MEM alpha Medium	Gibco Cell Culture Systems – Invitrogen, Karlsruhe, D
Methanol	Merck, Darmstadt, D
MgCl ₂ *6H ₂ O	Merck, Darmstadt, D
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	Merck, Darmstadt, D
NaCl	Merck, Darmstadt, D
NaCl-Lösung 0,9%	Braun, Melsungen, D
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	Merck, Darmstadt, D
Na-Pyruvat, 100 mM Lösung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
NotI HF (20.000U/ml)	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
NucleoBond Xtra Midi/Maxi® Kit	Macherey-Nagel GmbH, Düren, D
Nucleospin Plasmid QuickPure® Kit	Macherey-Nagel GmbH, Düren, D
OptiMEM Zellmedium	Gibco Cell Culture Systems – Invitrogen, Karlsruhe, D
Paraffin	Paraplast-Plus Paraffin, Sherwood, St. Louis, USA
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, D
PCR Wasser	Promega, Madison, WI, USA
Penicillin-Streptomycin-Lösung, flüssig 1000 I.E./ml Pen G 10.000µg/ml Streptomycin-Sulfat	Gibco Cell Culture Systems – Invitrogen, Karlsruhe, D
Pikrinsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
QIAquick® Gel Extraction Kit	Quiagen, Hilden, D
QIAquick® PCR Purification Kit	Quiagen, Hilden, D
Quick Ligation Kit	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
RedTaqPCR Reaction Mix	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Saccharose	Merck, Darmstadt, D
SDS	Merck, Darmstadt, D
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt, D
Tris-HCl (Trizma® hydrochloride)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Trypsin-EDTA-Lösung (10x),flüssig 0,5% Trypsin / 5,3 mM EDTA	Gibco Cell Culture Systems – Invitrogen, Karlsruhe, D
Trypton	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
Xylol	Merck, Darmstadt, D

3.1.4 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Inhaltstoffe	Endkonzentration
PBS-Puffer, pH 7,4	KH ₂ PO ₄	1,8 mM
	Na ₂ HPO ₄	10,3 mM
	NaCl	137 mM
	in Aqua dest.	
TE-Puffer	TRIS HCl, pH 7,6	10 mM
	EDTA, pH 8,0	1 mM
Tail-Buffer	EDTA	0,1 M
	SDS	0,5 %
	TRIS HCl, pH 8	50 mM
	in Aqua dest.	
Fixierlösung I, pH 7,4	EGTA	1 mM
	K ₂ HPO ₄	15 mM
	MgCl ₂	2 mM
	NaCl	90 mM
	Paraformaldehyd	3 %
	Saccharose	3,4 %
	in Aqua dest.	
Fixierlösung II, pH 7,4	Fixierlösung I	33,3 %
	PBS	66,6 %
	Saccharose gesamt	17 %
Kontroll-Lösung, pH 7,4 Patch Clamp	NaCl	145 mM
	KH ₂ PO ₄	0,4 mM
	K ₂ HPO ₄	1,6 mM
	Ca-Gluconat	1,3 mM
	MgCl ₂	1 mM
	Glucose	5 mM
	HEPES	5 mM
	in Aqua dest.	
Pipetten-Lösung, pH 7,2 Patch Clamp	ATP	3 mM
	CaCl ₂	0,726 mM
	EGTA	1 mM
	Glucose	5 mM
	K-Gluconat	95 mM
	KCl	30 mM
	MgCl ₂	2,38 mM
	Na ₂ HPO ₄	4,8 mM
	NaH ₂ PO ₄	1,2 mM
	in Aqua dest.	
LB-Medium	Trypton	0,1 g/l
	Hefeextrakt	0,5 g/l

	NaCl	171 mM
	in Aqua dest.	
CHO-Nährmedium	MEM alpha Medium	
	FCS	20 %
	Penicillin-Streptomycin	0,5 %
	Na-Pyruvat	1 mM
	L-Glutamin	2 mM
HEK-Nährmedium	MEM alpha Medium	
	FCS	10 %
	Penicillin-Streptomycin	1 %
Coating Medium für Deckgläschen	F-12 Nutrient Mixture (Ham)	97 ml
	Bovines Fibronectin, 1mg/ml	1 ml
	Collagen from calf skin, 1mg/ml 0,1M Essigsäure	1 ml
	Bovines Albumin 7,5%	50 µl
	Penicillin-Streptomycin	1 ml

3.1.5 Oligonukleotide

Gen		#	Primer-Sequenz 5'→ 3'	Annealing	Amplikon
Primer für Genotypisierung-PCR der KCNJ10(-/-)Maus					
mKCNJ10 WT	se	272	GATCTATGGACGACCTTCATTGACATGCAATGG	60°C	631bp
	as	273	GGCTGGTCTCATCTACCACATGGTAGAAAGTCAGG		
mKCNJ10 KO	neo	274	ATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTC	60°C	383bp
	as	273	GGCTGGTCTCATCTACCACATGGTAGAAAGTCAGG		
Primer für Klonierungs-PCR des hKCNJ16					
hKCNJ16 (I)	se	303	ACCCAAACCAAGAAATAGCAACAAG	64°C	1413bp
	as	304	AAGCCACGTTTACAACGACTTGAT		
hKCNJ16 (II)	se	299	GATGCGGCCGCACAGCAAAGAATGAGCTATT	57°C	1292bp
	as	300	GATGCGGCCGCTAGCCCTCATAATTGCAATTT		
Primer für Testsequenzierung des klonierten hKCNJ16 in pIRES CD8					
pIRES CD8	se	114	CTATAGGGGAGACCCAAGC	55°K	
	as	115	AGTACTCACCCCAACAGC		

3.1.6 Plasmide

Gen	Espressionsvektor	Hersteller
hKCNJ10 WT	pIRES CD8	Anselm A. Zdebik, University College London, UK
hKCNJ10 R65P		
hKCNJ16 WT		im Rahmen dieser Arbeit (s.u.)

3.1.7 Antikörper / Fluoreszenzfarbstoffe

Primär-Antikörper

Bezeichnung	„Host“	Verdünnung	Hersteller
anti-Aquaporin 2	goat	1:500	Santa Cruz, Heidelberg, D
anti-KCNJ10	rabbit	1:400	Alomone Lab, Jerusalem, IL
anti-KCNJ16	rabbit	1: 5000	Davids, Regensburg, D
anti-NCC	rabbit	1:400	Knepper, Bethesda, MD, USA
anti-NKCC2	rabbit	1:1000	Knepper, Bethesda, MD, USA
anti-Renin	chicken	1:400	Davids, Regensburg, D

Sekundär-Antikörper / Fluoreszenzfarbstoffe

Bezeichnung	Exzitation-Emission	Verdünnung	Hersteller
Alexa Fluor® 488 donkey anti rabbit	495 nm – 519 nm	1:400	Invitrogen, Karlsruhe, D
Alexa Fluor® 546 donkey anti goat	556 nm – 565 nm	1:400	Invitrogen, Karlsruhe, D
TRITC donkey anti chicken	550 nm – 570 nm	1:400	Dianova, Hamburg, D
HOE33342 (Stockkonzentr. 5×10^{-4})	346 nm – 460 nm	1:400	Invitrogen, Karlsruhe, D

3.1.8 Mäuse, Zellen

Organismus	Bezugsquelle
C57BL6-Maus	Charles River, Braunschweig, D und Eigenzucht
KCNJ10-Knockout-Maus	Drs. Neusch und Kirchhoff, MPI, Göttingen, D
CHO-Zellen	Cell Line Service, Eppelheim, D
HEK293-Zellen	Cell Line Service, Eppelheim, D
E.coli XL1 blue	Stratagene, Heidelberg, D und Eigenzucht

3.1.9 Software und Online-Dienste

Produkt	Hersteller
AxioVision LE Rel. 4.5	Carl Zeiss AG, Jena, D
CorelDRAW X3	Corel Corp., Ottawa, ON, CDN
Grapher 7	Golden Software Inc., Golden, CO, USA
ImageJ	McMaster Biophotonics Facility, Hamilton, ON, CDN
Metamorph V6.2r2	Molecular Devices Corp., Downingtown, PA, USA
BLAST eukaryotic genomes	NCBI, Bethesda, MD, USA

3.2 Tierexperimente

3.2.1 Versuchstiere und Genotypisierung der KCNJ10-Knockout-Maus

Sämtliche Experimente an lebenden Tieren bzw. an murinem Gewebe wurden mit C57BL6-Wildtyp-Mäusen und genveränderten Tieren (KCNJ10-Knockout) des Stammes SV129 durchgeführt. Tierhaltung und -versuche erfolgten nach Genehmigung der örtlichen Tierschutzbehörde und gemäß dem deutschen Tierschutzgesetz. Die Mäuse wurden bei einem 12-Stunden-Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Sie hatten freien Zugang zu Standardfutter und Wasser.

Die KCNJ10-Knockout-Maus (KCNJ10 $-/-$) wurde von Kofuji et al. durch homologe Rekombination generiert [66] und uns freundlicherweise von Drs. Neusch und Kirchhoff (MPI für Experimentelle Medizin, Göttingen) zur Verfügung gestellt. Bei dieser Maus wurde zur Inaktivierung des KCNJ10-Gens ein Genfragment der codierenden Region (CDS) gegen das Insert PGKneo, ein Neomycin-Resistenz-Gen, ausgetauscht.

Für die Genotypisierung wurde genomische DNA aus Schwanzbiopsien isoliert und mittels PCR amplifiziert. Für den Nachweis des (+/+)-Allels wurden Primer eingesetzt, die für das intakte KCNJ10-Gen spezifisch waren und ein Amplikon der Größe 631 bp lieferten. Der Nachweis des (-/-)-Allels erfolgte mittels eines KCNJ10-spezifischen Primers und eines Primers, der auf PKGneo lag, wobei das entsprechende Amplikon 383 bp groß war.

Für die Isolation der genomischen DNA wurden 2 - 3 mm lange Schwanzbiopsien mit 300 μ l Tail-Buffer und 1 μ l Proteinase K (50 mg/ml) bei 55°C über Nacht verdaut. Durch Zugabe von 100 μ l Ammoniumacetat (7,5 M) und 600 μ l Isopropanol (99%) wurde die DNA bei -20°C für 20 min gefällt und anschließend pelletiert. Nach Waschen mit Ethanol (70%) wurde das getrocknete Pellet in 50 μ l TE (pH 7.5) bei 55°C im Thermomixer resuspendiert.

Die Genotypisierungs-PCR erfolgte als Multiplex-PCR nach folgender Rezeptur:

<u>Ansatz:</u>	<u>Programm:</u>
2 μ l DNA	94°C 3 min
10 μ l RedTaq TM PCR Reaction Mix 2x	94°C 30 s
1 μ l Primer #272 (10mM)	60°C 30 s
2 μ l Primer #273 (10mM)	72°C 1 min
1 μ l Primer #274 (10mM)	72°C 10 min
4 μ l H ₂ O	4°C ∞

} 40x

Die Größe des Amplikons wurde mittels Agarosegelelektrophorese bestimmt.

3.2.2 Entwicklungsstudien an Wildtyp-Mäusen und KCNJ10-Knockout-Mäusen

Das Körperwachstum und die postnatale Veränderungen der renalen Ausscheidung wurden an C57BL6-Wildtyp-Mäusen aus 4 Würfen mit je 7 - 12 Jungen über 12 Wochen studiert.

Um den Effekt des KCNJ10-Knockouts auf die allgemeine Entwicklung und speziell auf die Nierenentwicklung zu prüfen, wurden die Tiere aus KCNJ10-genveränderten Zuchten nach der Genotypisierung auf gleiche Weise wie die C57BL6-Mäuse untersucht. Wegen der kurzen Lebensdauer der homozygoten Knockout-Tiere erstreckte sich deren Beobachtungszeitraum nur über die ersten 10 Lebenstage.

Körpergewicht. Während der ersten 20 Lebenstage wurden die Tiere täglich, in den folgenden zwei Monaten wöchentlich (5- oder 7-tägig) stets zur selben Tageszeit gewogen.

Kreatinin- und Elektrolytausscheidung. Die Urinentnahme erfolgte in den ersten drei Lebenswochen 2-tägig, später wöchentlich. Der Entnahmemodus war altersabhängig: Sehr junge Tiere wurden mittels einer 0,5 ml-Insulinspritze suprapubisch Blasen-punktiert. Bei jugendlichen Mäusen war der Urin trotz gezielter Manipulation schwierig und nur in geringen Mengen zu gewinnen, während adulte Tiere bereits bei leichter Massage der Harnblase größere Volumina abgaben. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Proben bei -20°C tiefgefroren.

Die Urin-Analyse umfasste die Kreatinin- und Kationenmessung: Kreatinin wurde nach dem Prinzip der *Jaffé*-Reaktion bestimmt. Hierbei bildet Kreatinin in alkalischer Lösung nach Zugabe von Pikrinsäure einen gelborangen Komplex, dessen Farbintensität zur Kreatininkonzentration proportional ist und photometrisch gemessen wird. In einer 96-Well-Mikrotiterplatte wurden 50 µl der verdünnten Urinproben (1:10 bzw. 1:25 in Aqua dest.) mit 150 µl Mastermix (50 µl Trichloressigsäure (1,2 N), 31 µl Pikrinsäure (13 g/l), 50 µl NaOH (1,6 N), 19 µl H₂O) versetzt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Farbintensität bei einer Wellenlänge von 520 nm photometrisch bestimmt. Die Kreatininkonzentration wurde anhand eines mitgeführten Kreatininstandards berechnet.

Die Kationenmessung erfolgte mittels Atomabsorptionsspektroskopie (Atomabsorptionsspektrometer Solaar M5, Thermo Electron) am Institut für Botanik der Universität Regensburg durch S. Bandulik (Institut für Physiologie) und G. Kolb (Institut für Botanik). Beiden Wissenschaftlern möchte ich an dieser Stelle meinen großen Dank aussprechen.

3.2.3 Statistische Auswertung und Darstellung der Daten

Die Daten sind als Mittelwerte mit den entsprechenden Standardfehlern des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Die Signifikanztestung erfolgte mittels des Student-t-Tests, wobei als Signifikanzniveau ein p-Wert < 0,05 akzeptiert wurde.

3.3 Histologische Verfahren

Um die histologische Reifung der Niere und die altersabhängige renale Kanalexpression zu beleuchten, untersuchte ich Organe von je drei C57BL6-Wildtyp-Mäusen im Alter von pp1, pp4, pp7, pp14, pp21, pp28 und pp56 (pp = post partum: Tage nach der Geburt).

3.3.1 Gewebefixierung durch arterielle Perfusion

Die Fixierung soll die natürlichen Verfallsprozesse des Gewebes verhindern und die histologische Struktur in einem möglichst unverfälschten Zustand bewahren. Das von uns verwendete Fixans Paraformaldehyd stabilisiert das Gewebe durch Quervernetzung der Proteinmoleküle.

Mäuse bis zum 28. Lebenstag wurden durch intraperitoneale Ketamin-Injektion (150 µg/g Körpergewicht) analgosediert. Nach medianer Thorakotomie und Laparatomie wurden das Herz freigelegt und die Leber zwecks Abfluss des Perfusats inzidiert. Über eine Kanüle im linken Herzventrikel erfolgte die arterielle Perfusion zunächst mit 2 - 5 ml körperwarmer Spüllösung (10 I.E./ml Heparin in NaCl 0,9%), anschließend mit 10 - 15 ml Fixierlösung I.

Die adulten Versuchstiere wurden durch Inhalationsanästhesie mit Isofluran (2,5% Isofluran in einem Gasgemisch aus 50% Sauerstoff und 50% Stickstoff) narkotisiert. Danach wurde das Abdomen eröffnet, die Aorta abdominalis wurde freigelegt und distal der Arteriae renales abgeklemmt. Kaudal der Klemme wurde der Perfusionskatheter eingeführt und mit einer weiteren Klemme fixiert. Zum Abfluss des Perfusats wurde die Vena cava inferior eröffnet. Nach Entfernung der proximalen Aortenklemme wurden über den Katheter zunächst 10 ml Spüllösung (10 I.E./ml Heparin in NaCl 0,9%), anschließend 40 ml Fixierlösung I mit einem konstanten Fluss von 15 ml/min über eine Rollerpumpe perfundiert.

Nach erfolgreicher Perfusion wurden die Nieren entnommen, senkrecht zur Längsachse halbiert und zwecks Nachfixierung und Gefrierschutz für einige Stunden in die Fixierlösung II überführt.

Entsprechend der späteren Verwendung erfolgten die weiteren Verarbeitungsschritte: Organe für immunhistochemische Färbungen auf Gefrierschnitten wurden im Sinne eines schonenden sequenziellen Tiefgefrierens zuerst für wenige Sekunden in -40°C kaltes 2-Methylbutan getaucht und anschließend bei -80°C gelagert. Gewebe, welches nach Paraffineinbettung einer HE-Färbung unterzogen werden sollte, wurde bis zur Einbettung in Methanol (70%) bei +4°C gelagert.

3.3.2 Immunfluoreszenzfärbungen auf Gefrierschnitten

Immunhistochemische Methoden machen sich die Eigenschaft von Antikörpern zunutze, spezifisch an bestimmte Epitope zu binden.

Bei der von uns verwendeten Technik, der indirekten Immunfluoreszenz (IF), wurde das Gewebe mit einem proteinspezifischen Primärantikörper inkubiert. Dieser konnte anschließend mit einem Fluorochrom-markierten Sekundärantikörper, der seinerseits an das F_c-Fragment des Primärantikörpers bindet, detektiert werden.

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden 5 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt und auf Polylysin-beschichtete Objektträger aufgezogen. Vor dem Färbevorgang wurden die Gewebeschnitte 5 min mit PBS gewaschen und für weitere 5 min zur Demaskierung der Epitope mit SDS (0,1% in PBS) behandelt. Nach 2x 5 min Waschen mit PBS wurden die Schnitte 10 min in BSA (5 % in Triton X-100 0,04% in PBS) inkubiert, um unspezifische Antikörper-Bindestellen zu blockieren. BSA wurde durch Waschen (5 min mit PBS) entfernt. Sodann erfolgte die Inkubation der Schnitte mit den unterschiedlichen Primärantikörpern (verdünnt in BSA 5 % in Triton X-100 0,04% in PBS) in einer feuchten Kammer bei +4°C über Nacht. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper (verdünnt in BSA 5 % in Triton X-100 0,04% in PBS) aufgebracht und 1 h unter Lichtabschluss bei Raumtemperatur inkubiert. Nach letztmaligem Waschen (5 min in PBS und anschließend kurz in Aqua dest.) wurden die Schnitte mit Glycergel® Mounting-Medium und Deckgläschen versiegelt.

3.3.3 Hämatoxylin/Eosin-Färbung (HE-Färbung) auf Paraffinschnitten

Die HE-Färbung gilt als die Standardfärbung in der Histologie und liefert einen Überblick über die Struktur des Gewebes. Das Probenmaterial wird dafür Paraffin-eingebettet.

Vor der Einbettung wurden die Nieren zur Dehydrierung durch eine aufsteigende Methanolreihe (70%, 80%, 90%, 100%; jeweils für 30 min) geführt und danach 30 min mit Isopropanol (100%) gespült. Nach 30-minütiger Behandlung mit 55°C warmem Isopropanol/Paraffin-Gemisch (1:1) erfolgte die Inkubation der Gewebestücke für 2x 24 h in 60°C warmem Paraffin. Schließlich wurden die Paraffin-durchtränkten Nieren in Edelstahlförmchen überführt, mit 60°C warmem Paraffin überschichtet und zur Aushärtung über Nacht auf 4°C gekühlt. Anschließend stellte man am Rotations-Mikrotom 5 µm dünne Schnitte her, die auf Superfrost-Objektträger aufgezogen wurden.

Zur Entparaffinierung und Rehydrierung wurden die Objektträger für je 12 min 2x in Xylol, dann in Isopropanol (99%) und eine absteigende Ethanolreihe (99%, 95%, 80%, 70%) überführt. Schließlich wurde 5 min mit PBS gewaschen.

Im ersten Färbeschritt wurden die Schnitte 3 min mit Mayer's Hämalaun inkubiert, kurz in Aqua dest. mit Eisessig (1 ml auf 100 ml Aqua dest.) getaucht und durch 2 min Spülen mit Leitungswasser „gebläut“. Zur Gegenfärbung überführte man die Objektträger für 2 min in 2%-alkoholisches Eosin.

Die erneute Dehydrierung erfolgte durch 2- bis 3-maliges Eintauchen in Ethanol (70%), Ethanol (80%), Ethanol (95%), Ethanol (99%) und Isopropanol (99%), sowie 2x 5 min Xylol. Abschließend wurden die Schnitte mit DePex Medium und Deckgläschen eingedeckelt.

3.3.4 Mikroskopie

Die Visualisierung und Digitalisierung der IF-gefärbten Nierenschnitte erfolgte einerseits als Detailaufnahmen (20fache Vergrößerung), andererseits als Übersichtsaufnahmen des gesamten Nierenquerschnitts.

Die Detailaufnahmen wurden mit dem Invertmikroskop Axiovert 200, Zeiss (Objektiv: Plan Apochromat 20x), der Schwarzweiss-CCD-Kamera Coolsnap HQ und der Software Metamorph V6.2r2 generiert.

Die Herstellung der Übersichtsaufnahmen erforderte aufgrund der Größe der Schnitte eine quadrantenweise Akquisition mittels des vollmotorisierten Invertmikroskops Axiovert 200M, Zeiss (Objektiv: EC Plan-Neofluar 10x/0.30) und der Schwarzweiß-CCD-Kamera AxioCam MR3. Anschließend wurden die Einzelbilder mittels der Software AxioVision LE Rel. 4.5 zusammengefügt.

Die Fluorochrom-gekoppelten Sekundär-Antikörper wurden dabei mit einer Wellenlänge von 465 - 495 nm (Alexa Fluor® 488) und 530 - 555 nm (Alexa Fluor® 546 und TRITC) angeregt. Das emittierte Fluoreszenzsignal wurde mit Bandpass-Filtern von 505 - 530 nm (Alexa Fluor® 488) und 560 - 615 nm (Alexa Fluor® 546 und TRITC) detektiert.

Die Visualisierung und Digitalisierung der HE-Färbungen erfolgte mittels des Invertmikroskops Axio Imager M1 (Objektiv: Plan-Neofluar 10x/0.30 Ph1), der Farb-CCD-Kamera AxioCamHR und des Programms AxioVision LE Rel. 4.5.

3.4 Molekularbiologische Methoden

Ziel der molekularbiologischen Arbeiten war die Klonierung des humanen Kaliumkanals hKCNJ16 in den Vektor pIRES CD8. Bei pIRES CD8 handelt es sich um einen bicistronischen Expressionsvektor für eukaryotische Zellen, bei dem das Target-Gen unter dem Promoter des CMV-Virus steht. Ferner exprimieren transfizierte Zellen das humane Oberflächenantigen CD8, das zur Identifikation transfizierter Zellen genutzt werden kann.

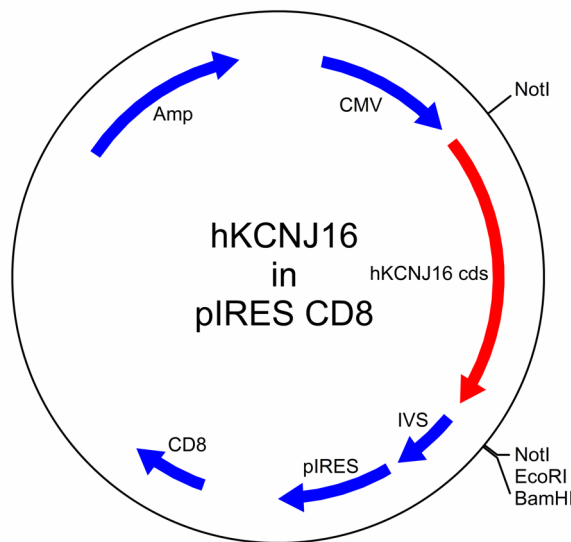


Abb. 3.1: hKCNJ10 in pIRES CD8 (Plasmidkarte). **Das Insert hKCNJ16 (1292 bp) wurde über die NotI-Schnittstelle in den Vektor pIRES CD8 (5130 bp) kloniert.**

3.4.1 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein enzymabhängiges Verfahren zur selektiven Amplifikation definierter DNA-Sequenzen aus einem Nukleinsäuregemisch mit Hilfe sequenzspezifischer Primer und thermostabiler DNA-Polymerasen.

Eine Sonderform stellt die hochsensitive „nested PCR“ (geschachtelte PCR) dar. Hier werden zwei Polymerasekettenreaktionen hintereinander geschaltet, wobei das Produkt der ersten PCR als Template der zweiten PCR dient. In der zweiten PCR wird durch ein weiteres Primerpaar, das an randständige Nukleotidsequenzen des ersten PCR-Produkts bindet, ein kürzeres DNA-Fragment amplifiziert. Der Vorteil der „nested PCR“ gegenüber der Standard-PCR ist eine um etwa 10^2 - 10^3 fach höhere Sensitivität gepaart mit einer gesteigerten Spezifität, da für das „nested PCR“-Produkt nur das Produkt der ersten Amplifikation als Matrize dienen kann.

Die Amplifikation der codierenden Sequenz (CDS) des hKCNJ16 aus einem Multiple Tissue cDNA Panel erforderte den Einsatz einer „nested PCR“, die nach folgender Rezeptur in einem abgestuften PCR-Programm erfolgreich durchgeführt wurde.

PCR I	4 µl	cDNA panel	94°C	3 min	
	5 µl	HiFi Buffer 10x	94°C	30 s	} 4x
	1 µl	Primer #303 (10uM)	58°C	30 s	
	1 µl	Primer #304 (10uM)	72°C	150 s	
	2 µl	dNTP Mix (10mM)	94°C	30 s	} 30x
	1 µl	Hifi Polymerase	56°C	30 s	
	36 µl	H ₂ O	72°C	150 s	
	3 µl	DMSO	72°C	5 min	
			4°C	∞	
PCR II	4 µl	Produkt PCR I	94°C	3 min	
	5 µl	HiFi Buffer 10x	94°C	30 s	} 4x
	1 µl	Primer #299 (10uM)	58°C	30 s	
	1 µl	Primer #300 (10uM)	72°C	150 s	
	2 µl	dNTP Mix (10mM)	94°C	30 s	} 30x
	1 µl	Hifi Polymerase	56°C	30 s	
	36 µl	H ₂ O	72°C	150 s	
	3 µl	DMSO	72°C	5 min	
			4°C	∞	

Um die Effizienz der PCR abzuschätzen, wurden 2 µl des PCRII-Produkts mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Das restliche PCRII-Produkt wurde mit dem QIAquick® PCR Purification Kit nach Anweisung des Herstellers aufgereinigt.

3.4.2 Restriktionsverdau und Dephosphorylierung

Für die Klonierung der hKCNJ16 CDS in den Expressionsvektor wurde sowohl das aufgereinigte PCRII-Produkt als auch das Plasmid pIRES CD8 mit dem Restriktionsenzym NotI geschnitten.

Vektorpräparation

3 µl	pIRES CD8 (1ug/µl)
7 µl	Puffer 3 10x
0,7 µl	BSA 100x
2,5 µl	NotI HF (20.000U/ml)
56,8 µl	H ₂ O

Präparation des PCRII-Produkts

28 µl	PCRII-Produkt (aufgereinigt)
7 µl	Puffer 3 10x
0,7 µl	BSA 100x
2 µl	NotI HF (20.000 U/ml)
32,3 µl	H ₂ O

Beide Ansätze wurden 3 h bei 37°C bei inkubiert.

Um die Religation des Vektors bei der Klonierung zu reduzieren, wurden die durch Restriktionsverdau geschnittenen Enden des Vektors dephosphoryliert. Dazu versetzte man den Vektorpräparationsansatz mit 3 µl alkalischer Phosphatase (10.000 U/ml) und verdaute 1 h bei 37°C. Anschließend wurden beide Restriktionsansätze durch Agarosegelelektrophorese (2%) aufgetrennt, die entsprechenden Banden (1,3 kb bzw. 5,1 kb) unter UV-Licht aus dem Gel exzidiert und die DNA mittels des QIAquick® Gel Extraction Kit isoliert.

3.4.3 Ligation

Bei der Ligation wurde die NotI-geschnittene hKCNJ16 CDS mit dem linearisierten pIRES CD8 verbunden und so ein zirkuläres Plasmid erzeugt.

Ligationsansatz

- 1,5 µl pIRES CD8 (NotI-geschnitten und dephosphoryliert) (50ng)
- 3 µl PCRII-Produkt (NotI-geschnitten)
- 10 µl Ligase Puffer Quick 2x
- 1 µl T4 Ligase Quick
- 4,5 µl H₂O

Der Ligationsansatz wurde zunächst 15 min bei Raumtemperatur, danach 5 min auf Eis inkubiert.

3.4.4 Transformation

Im Folgenden wurde das Vektor-Insert-Konstrukt in kompetenten Bakterien des Stammes E.coli XL1 blue eingebracht, also transformiert.

Dazu wurden 100 µl Bakteriensuspension mit 20 µl Ligationsansatz beimpft und für 15 min auf Eis, für 30 s bei 42°C und nochmals für 2 min auf Eis inkubiert. Die DNA-Bakteriensuspension wurde dann mit 700 µl LB-Medium versetzt und für 1 h bei 37°C im Thermomixer inkubiert. Währenddessen entwickelten die transformierten Zellen die für die spätere Selektion ausschlaggebende Ampicillin-Resistenz.

Danach wurde der Ansatz 3 min bei 3.000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde auf einer vorgewärmten Ampicillin-LB-Agar-Platte (50 µg Ampicillin/ml) ausplattiert und bei 37°C über Nacht bebrütet.

Die nach 12 h auf den Platten gewachsenen Bakterienkolonien hatten entweder das ungeschnittene Plasmid, das geschnittene religierte Plasmid ohne Insert oder aber im erfolgreichen Fall das geschnittene religierte Plasmid mit Insert inkorporiert und daher die Ampicillin-Resistenz entwickelt.

3.4.5 Übernachtkulturen

Die Übernachtkulturen dienten sowohl der Selektion als auch der Amplifikation derjenigen Bakterien, die das gewünschte Vektor-Insert-Konstrukt aufgenommen hatten.

Es wurden zunächst 10 Kolonien mittels steriler Pipettenspitzen von der Kulturplatte gepickt und in je 3 ml Nährmedium (LB-Medium, 50 µg Ampicillin/ml) überführt. Das angeimpfte Medium wurde bei 37°C über Nacht im Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden 2 ml aus jeder Probe entnommen und daraus die Plasmid-DNA mit dem Nucleospin Plasmid Kit isoliert. Um zu entscheiden, ob die extrahierten Plasmide das Insert eingebaut hatten, wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt.

Ansatz des analytischen Restriktionsverdaus

1 µl Plasmid-DNA (100 - 150 ng)
1,2 µl Puffer 3 10x
0,12 µl BSA 100x
0,2 µl NotI HF (20.000 U/ml)
10,48 µl H₂O

Nach Inkubation (2 h, 37°C) wurden alle 10 Verdaue gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Aufgrund des Bandenmusters konnten diejenigen Übernachtkulturen identifiziert werden, die pIRES CD8 *und* die KCNJ16 CDS enthielten (5,1 kb Bande *und* 1,3 kb Bande). Zusätzlich wurde die Richtigkeit des Inserts und dessen Orientierung im Plasmid untersucht, wozu jeweils 0,5 µg Plasmid-DNA mit den entsprechenden Sequenzierungsprimern (Primer #114 / Primer #115) versehen von der Firma SeqLab, Göttingen, sequenziert wurde.

Die Übernachtkulturen der Vektor-Insert-tragenden Klone wurden nun dazu verwendet, das Plasmid in größerem Umfang zu amplifizieren. Dazu wurden je 50 ml Nährmedium (LB-Medium, 50 µg Ampicillin/ml) mit 50 µl der entsprechenden Bakteriensuspension angeimpft und bei 37°C über Nacht im Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde aus dem gesamten Ansatz die Plasmid-DNA mittels des Nucleobond Xtra Midi/Maxi Kits extrahiert und in 50 µl TE (Tris/EDTA Puffer) gelöst. Nach photometrischer Konzentrationsbestimmung wurden die Plasmidsuspensionen durch weitere Zugabe von TE auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt.

3.5 Zellkultur

Um die humanen Kaliumkanäle hKCNJ10 und hKCNJ16 elektrophysiologisch zu analysieren, wurden diese heterolog in den epithelial wachsenden Säugetierzelllinien CHO (Chinese Hamster Ovary) und HEK293 (Human Embryonic Kidney) exprimiert. Die transiente Transfektion erfolgte als Mono- und Cotransfektion. Bei letzterer wurde die DNA des hKCNJ10 und hKCNJ16 im Verhältnis 1:10 eingesetzt, um die Expression unerwünschter hKCNJ10-Homomere zu reduzieren [48, 59]. Als Kontrolle dienten „scheintransfizierte“ Zellen, die der Transfektionsprozedur ohne Zugabe von DNA unterzogen wurden. Alle verwendeten Genkonstrukte waren durch Subklonierung in den Expressionsvektor pIRES CD8 integriert worden, der neben dem Target-Gen das humane Oberflächenprotein CD8 zur Expression bringt, und so die Selektion zwischen transfizierten und untransfizierten Zellen erlaubt.

3.5.1 Aussäen

Vor der Transfektion wurden die Zellen, die in einer großen Petrischale gewachsen waren, mit DPBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin-EDTA bei 37°C inkubiert (3 min für HEK, 10 min für CHO). Die abgelösten Zellen wurden zur Elimination des Protease-Chelatbildner-Gemisches Trypsin-EDTA in 6 ml Nährmedium überführt, durch Zentrifugation (3 min bei 1000 rpm) sedimentiert und in 4 ml frischem HEK-/CHO-Nährmedium resuspendiert. Je nach Konzentration wurden 50 bis 200 µl Zellsuspension auf kleine Zellkulturschälchen (Ø 3 cm) ausgesät, in welchen 2 ml Nährmedium und ein rundes, gecoatetes Glasplättchen vorgelegt worden waren. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

3.5.2 Transfektion

Die zu untersuchenden Genkonstrukte wurden durch Lipofektion in die Zelle eingebracht. Das Transfektionsreagenz Lipofectamine™ 2000 (DOSPA = 2,3-Diolyloxy-N-[2(spermincabox-amido)ethyl]) schließt als Polykation die saure DNA in ein kationisches Liposom ein, um von der Zelle endozytiert zu werden. Für jedes Genkonstrukt bzw. jede Kombination wurde ein eigener Transfektionsansatz hergestellt: Zunächst wurden die Plasmid-DNA und Lipofectamine™ 2000 (Rezepturen s. Tab. 3.1) getrennt voneinander in je 0,5 ml OptiMEM verdünnt, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, dann vorsichtig gemischt und für weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde das Nährmedium aus den vorbereiteten Zellkulturschälchen abgesaugt und der Zellrasen mit dem Transfektionsansatz überschichtet. Letzterer wurde nach 3 h Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ durch 2 ml frisches Nährmedium ersetzt. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ über Nacht kultiviert.

		CHO-Zellen für Whole-cell- Experimente	HEK293-Zellen für Einzelkanal- Experimente
Monotransfektion	Lipofectamine™ 2000 Plasmid 1	2 µl 0,5 µg	4 µl 2 µg
Cotransfektion (1:10)	Lipofectamine™ 2000 Plasmid 2 + Plasmid 3	2 µl 0,05 µg + 0,45 µg	4 µl 0,2 µg + 1,8 µg
Plasmid 1: hKCNJ10 WT, hKCNJ10 R65P, hKCNJ16 WT Plasmid 2: hKCNJ10 WT, hKCNJ10 R65P Plasmid 3: hKCNJ16 WT			
Mengenangaben beziehen sich auf ein Zellkulturschälchen (Ø 3 cm).			

Tab. 3.1: Transfektionsschema für CHO-Zellen (Whole-cell-Experimente) und HEK293-Zellen (Einzelkanalexperimente).

Vor den Patch-Clamp-Experimenten wurde das Nährmedium gegen eine Dynabeads-haltige Elektrolytlösung (s. Kap. 3.6) ausgetauscht.

Die anti-hCD8-beschichteten Kügelchen (Dynabeads) binden an hCD8-exprimierenden, also transfizierten Zellen, die dadurch optisch detektiert werden konnten.

3.6 Elektrophysiologie – Patch-Clamp-Technik

Die von Neher und Sakmann in 1976 [93] etablierte und in den Folgejahren weiterentwickelte Patch-Clamp-Technik erlaubt es, elektrische Eigenschaften von Zellen auf der Ebene einzelner Ionenkanäle zu messen. Dazu werden fein ausgezogene, mit Elektrolytlösung gefüllte Glaskapillaren (= Pipetten; äußerer Spitzendurchmesser 1 - 3 μm) mittels Mikromanipulator unter optischer Kontrolle auf die Zelloberfläche platziert. Um den Membranfleck unter der Pipette elektrisch zu isolieren, wird durch den angelegten Unterdruck ein Abdichtungswiderstand von mehreren Gigaohm zwischen Zelle und Pipette erzeugt (sog. „Gigaseal“). So lassen sich bei vorgegebener Klemmspannung entsprechend des Versuchsaufbaus (s. Abb. 3.2, links) kleinste Ströme (im pA-Bereich) durch den isolierten Patch messen. Je nach Fragestellung können ausgehend vom Gigaseal weitere Messanordnungen generiert werden (s. Abb. 3.2, rechts).

Alle von uns durchgeführten Experimente erfolgten bei Raumtemperatur. Das Bad, dessen Boden ein zellbewachsenes Glasplättchen bildete, wurde über einen Zu- und Ablauf kontinuierlich mit frischer Badlösung (s. Kap. 3.1.4: Kontroll-Lösung) befüllt. Die verwendeten Pipetten wurden aus Borosilikatglaskapillaren auf einen Widerstand von etwa 10 M Ω ausgezogen. Als Verstärker kamen ein EPC-10 Patch Clamp Amplifier (HEKA) und ein EPC-7-Nachbau (Dr. U. Fröbe, Freiburg) zum Einsatz.

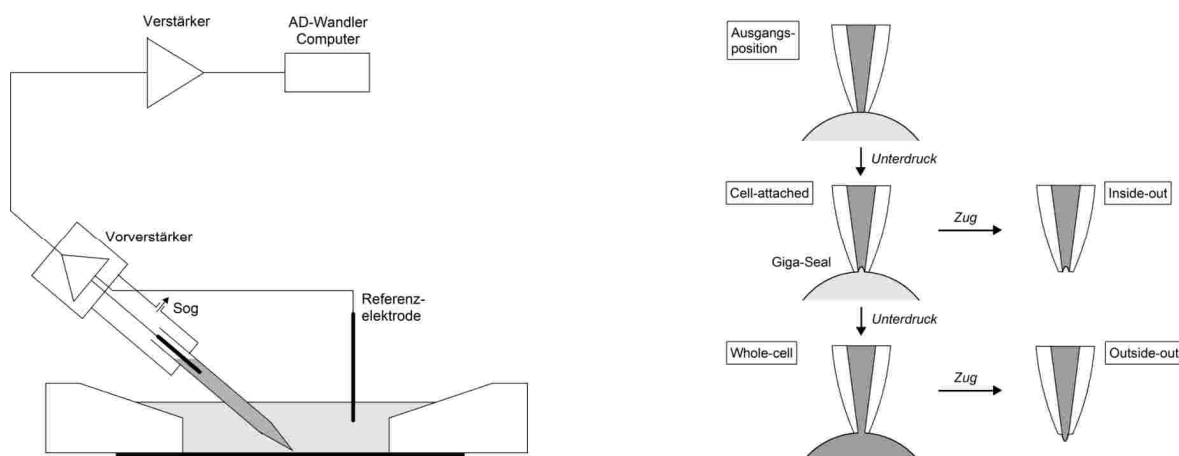


Abb. 3.2: Patch-Clamp-Technik: Messanordnung und Konfigurationen. *Links:* Vereinfachte Darstellung der Patch-Clamp-Messanordnung. *Rechts:* Die wichtigsten Konfigurationen der Patch-Clamp-Technik und ihre Herstellung.

3.6.1 Whole-cell-Experimente

Um die elektrophysiologischen Eigenschaften der Zelle als Ganzes zu erfassen, wird das Patch nach Ausbildung des Gigaseals eingerissen und eine direkte Verbindung zwischen dem Zellinneren und der cytosolähnlichen Pipettenlösung (s. Kap. 3.1.4: Pipetten-Lösung) geschaffen, die sog. Whole-cell-Konfiguration (s. Abb. 3.2, rechts). An den transfizierten CHO-Zellen wurden

die Whole-cell-Ströme in Abhängigkeit von der angelegten Klemmspannung (Voltage Clamp) gemessen. Zudem ermittelte man das Membranpotential, also die Spannung, bei der kein Strom (Current Clamp (CC) Zero) über die Zelle fließt. Das Protokoll sah eine „Spannungstreppe“ von -120 mV bis +30 mV in 30 mV-Schritten zu je 2 s vor, die alle 10 bzw. 20 s mit dem CC-Zero-Modus abwechselte.

Um die Aktivität der Kaliumkanäle vom Hintergrundstrom abzugrenzen, wurde die Badlösung mit dem Kaliumkanalinhibitor Barium versetzt, genauer: die Standard-Badlösung gegen eine Bariumhaltige Lösung (5mM) ausgetauscht. Danach wurden das Membranpotential und der Kaliumkanal-unabhängige Strom gemessen.

3.6.2 Einzelkanal-Experimente

Die Einzelkanalmessungen erfolgten an transfizierten HEK293-Zellen in der Cell-attached-Konfiguration (s. Abb. 3.2, rechts).

Im Cell-attached-Modus wird der Strom über den angesaugten Patch (zuzüglich der Leckströme des Seals) unmittelbar nach Ausbildung des Gigaseals gemessen. Von Vorteil ist, dass das intrazelluläre Milieu unberührt bleibt und sämtliche Signalkaskaden und Stoffwechselprozesse im Zellinneren ungestört ablaufen können. Unter Verwendung einer cytosolähnlichen Pipettenlösung (s. Kap. 3.1.4: Pipetten-Lösung) wird der chemische Gradient über der Patchmembran eliminiert, so dass die Triebkraft der dortigen Kanäle lediglich vom Membranpotential und der Klemmspannung bestimmt wird. Da das Membranareal in der Pipettenspitze nur wenige Quadratmikrometer misst, befinden sich im Patch meist nur wenige Ionenkanäle. So kann aus dem Gesamtstrom über dem Patch auf das biophysikalische Verhalten der Einzelkanäle geschlossen werden. Einzelkanalströme und Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle wurde bei einer Klemmspannung $V_c = 0$ mV gemessen.

3.6.3 Erhebung und Darstellung der Daten

Die elektrophysiologischen Daten wurden in Zusammenarbeit mit Evelyn Humberg geb. Lieberer erhoben. In der vorliegenden Arbeit werden die Messungen in Form von repräsentativen Originaldaten graphisch dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Entwicklungsprofil von Wildtyp-Mäusen

Mäuse kommen verhältnismäßig unreif zur Welt, so dass deren postnatale Entwicklung binnen weniger Wochen rasch und zum Teil sprunghaft voranschreitet. Dieses dynamische Geschehen ist bei Mäusen insbesondere mit Blick auf die Nierenfunktion und den Elektrolythaushalt nur unzureichend untersucht.

Ich habe daher die altersabhängigen Veränderungen folgender Parameter an Mäusen des Stammes C57BL6 studiert:

- Körperwachstum
- Morphologie und Transportproteinexpression der Niere
- renale Ausscheidungsfunktion von Kreatinin und Kationen

Unter Beobachtung standen vier Würfe mit 8, 9, 10 und 12 Jungtieren. Das Experiment erstreckte sich über einen Zeitraum von 12 Wochen, wobei die Daten zu Beginn täglich, später in größeren Zeitabständen erhoben wurden.

Das Alter der Tiere wird im Folgenden meist als *pp* (post partum: Tage nach Geburt) angegeben. Mit ca. 4 Wochen gelten Mäuse als geschlechtsreif, mit 2 Monaten als erwachsen.

4.1.1 Körperwachstum

Im vorliegenden Experiment (s. Abb. 4.1 A) betrug das Gewicht bei Geburt (*pp*1) im Mittel $1,42 \pm 0,03$ g, wobei ein Minimum von 1,17 g und ein Maximum von 1,63 g zu verzeichnen war. In den ersten 15 Lebenstagen nahmen die Mäuse nahezu linear zu, täglich durchschnittlich 0,4 g, so dass sich innerhalb dieses Zeitraums das Geburtsgewicht bereits verfünffacht hatte. Der Phase konstanter Zunahme folgte eine 5-tägige Stagnation bis Regression, in der die Tiere zwischen 0,21 g und 1,22 g verloren. Ursache dieses Stillstands war mutmaßlich die Umstellung der Ernährung von Muttermilch auf Fertigfutter und Wasser. Eine erneute Gewichtszunahme setzte mit Beginn der 4. Lebenswoche ein: Ähnlich rasant wie in den ersten Tagen nahmen die Tiere durchschnittlich 0,46 g pro Tag zu. Ab der 8. Woche reduzierte sich die tägliche Zunahme auf 0,16 g. Nach 12 Wochen wogen die Mäuse nahezu das 20fache ihres Geburtsgewichts.

Offensichtlich verläuft die Gewichtsentwicklung in den ersten Wochen relativ homogen, wo hingegen sich bei geschlechtsreifen Tieren (nach Woche 4) deutliche interindividuelle Schwankungen zeigen, was sich im Anstieg des Standardfehlers widerspiegelt.

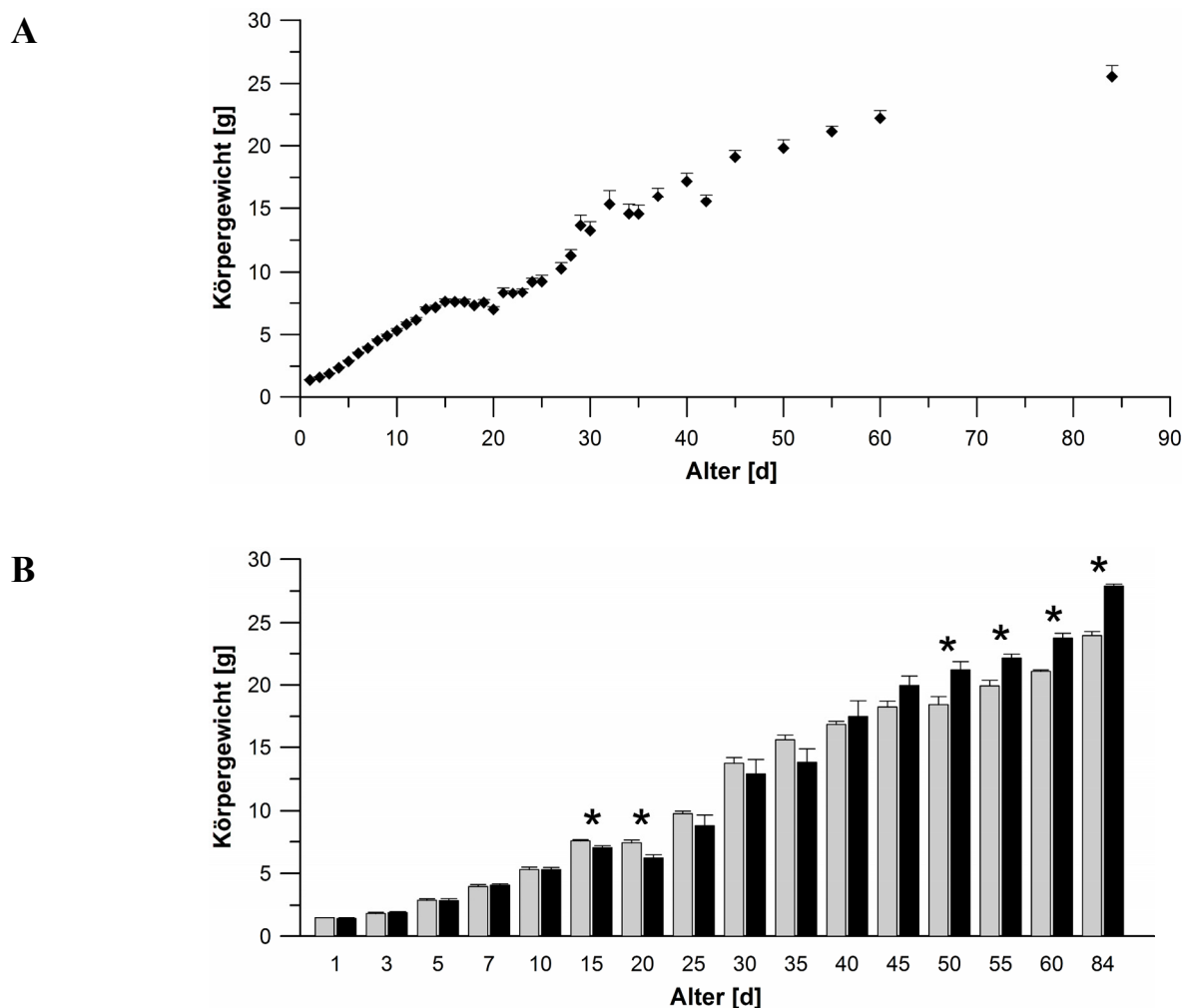


Abb. 4.1: Körperwachstum von C57BL6 Wildtyp-Mäusen während der ersten drei Lebensmonate.

A Mittelwerte des Körpergewichts (mit SEM), beide Geschlechter zusammengefasst. **B** Gegenüberstellung des mittleren Körpergewichts (mit SEM) der weiblichen (grau) und männlichen (schwarz) Tiere. Die Geschlechtsbestimmung der Jungtiere erfolgte entweder retrospektiv oder am Operationssitus, falls das Tier vor dem Auftreten äußerer Geschlechtsmerkmale getötet wurde. [pp1-7 n=24-39, pp8-14 n=18-27, pp15-21 n=11-23, pp22-84 n=3-12] * signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern ($p < 0.05$).

Signifikante Gewichtsunterschiede zwischen den beiden Geschlechtern wurden in zwei Phasen augenfällig (s. Abb. 4.1 B): Während die Männchen von der Gewichtsstagnation während der Abstillperiode (pp15 - pp20) stärker betroffen waren, hielten die Weibchen ihr Gewicht relativ konstant. Erst ab der 8. Woche markierte sich die geschlechtstypische Größenüberlegenheit der Männchen.

4.1.2 Morphologie und Transportproteinexpression in der Niere

4.1.2.1 Morphologie

Morphologische Veränderungen während des ersten Lebensmonats werden im Folgenden anhand von Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbungen (s. Abb. 4.2) zu den Zeitpunkten pp1, pp4, pp7, pp14, pp21 und pp28 erläutert.

Frühe Entwicklungsstufen (pp1, pp4, pp7) zeigten aufgrund der synchron ablaufenden Differenzierung und Größenzunahme ein heterogenes Bild. Verglichen mit der adulten Niere war der interstitielle Raum vergrößert; die Tubuli nahmen besonders in den zentralen Abschnitten wenig Raum ein. Die typische Zonierung in Rinde und Mark fehlte noch. Die epithelialen Organanteile, i.e. Glomerula und Tubuli, waren durch die Koexistenz unterschiedlicher Reifegrade gekennzeichnet, was sich an deutlichen Kaliberschwankungen und variablen Lumendurchmessern der Tubuli zeigte. Auffällig war die zelldichte subkapsuläre Region, wo Zellkonglomerate die künftigen Glomerula und Tubuli andeuteten. In diesen Bereichen waren die Formation des Bowman-Kapselraumes und die Lumenbildung der Tubuli noch nicht vollzogen.

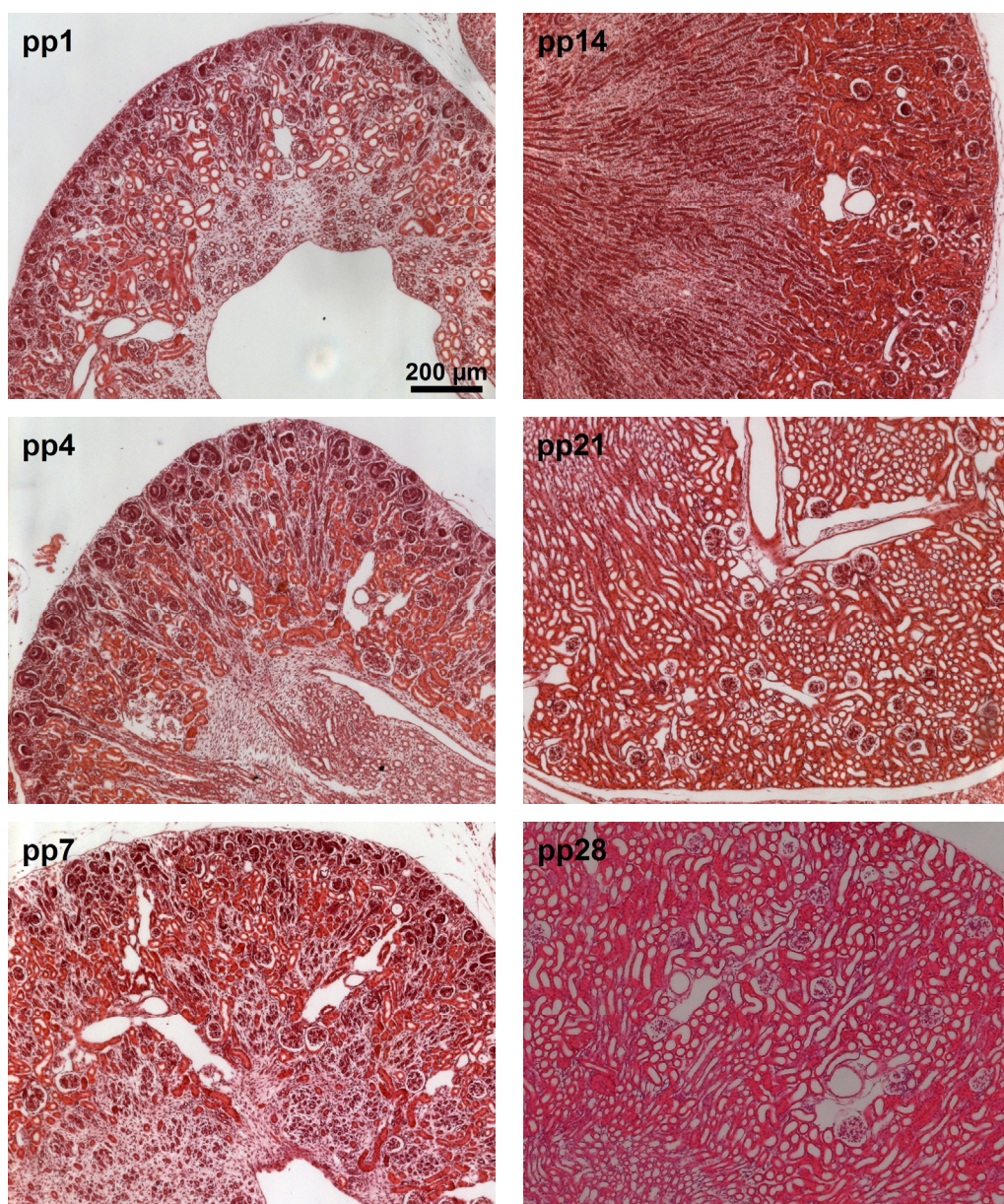


Abb. 4.2: Morphologische Veränderung der Mauseiere während des ersten Lebensmonats.

Hämatoxilin-Eosin-Färbungen (HE-Färbungen) der Nieren zu den Zeitpunkten pp1, pp4, pp7, pp14, pp21 und pp28. Proliferation, zentrifugale Differenzierung und Zonierung des Parenchyms.

Während sich die Nierenmorphologie in der ersten Lebenswoche nur geringfügig veränderte, ereignete sich der entscheidende Entwicklungsschritt zwischen pp7 und pp21. Das histologische Präparat der 14 Tage alten Niere markiert demnach ein Intermediärstadium.

Nach der dritten Woche scheint die morphologische Entwicklung nahezu abgeschlossen zu sein. Nieren älterer Tiere (pp21, pp28) imponierten durch eine strenge Ordnung, durch die klare Zonierung in Rinde und Mark sowie durch ein regional gleichförmiges und dichtes Parenchym mit wenig interstitiellem Raum.

Die postnatale renale Morphogenese umfasst dem zufolge Proliferation, zentrifugale Differenzierung und Zonierung des Parenchyms.

4.1.2.2 Entwicklung der Transportproteinexpression

Um die funktionelle Reifung der murinen Niere, speziell die Veränderungen im distalen Tubulus, besser zu verstehen und um die entwicklungsabhängigen Expressionunterschiede einiger segmentspezifischer Transportproteine darzustellen, untersuchte ich die renale Expression der Markerproteine NKCC2 (Na^+ - K^+ - Cl^- -Cotransporter, Marker für die dicke aufsteigende Henle-Schleife), NCC (NaCl -Cotransporter, Marker für das frühe distale Konvolut) und AQP2 (Aquaporin 2, Marker für die Hauptzellen des Verbindungsstücks und des Sammelrohrs) zu den Zeitpunkten pp1, pp4, pp7, pp14, pp21, pp28 und pp56. Darüber hinaus wies ich an den entsprechenden Gewebeschnitten die Kaliumkanäle KCNJ10 (Kir4.1) und KCNJ16 (Kir5.1) nach, welche derzeit im Mittelpunkt unserer Forschungstätigkeit stehen. Die in Abb. 4.3 - 4.7 dargestellten Immunfluoreszenz-Färbungen demonstrieren die markanten Veränderungen, welche sich vor allem binnen der ersten beiden Lebenswochen vollzogen.

Die Zusammenschau sämtlicher Alterstrufen zeigt, dass alle fünf untersuchten Transportproteine bereits zum Zeitpunkt der Geburt mehr oder weniger stark exprimiert wurden. Außerdem wird die oben beschriebene zentrifugale Entwicklungsdynamik evident: Während im Neonaten (pp1) die subkapsulären Abschnitte, also die nephrogene Zone, frei von jeglichem spezifischen Signal für die oben genannten Marker waren, ließen sich letztere am Ende der zweiten Lebenswoche (pp14) auch in den peripheren Kortexanteilen nachweisen (s. Abb. 4.3 - 4.7, links). Die Detailaufnahmen verdeutlichen einerseits die Lokalisation der Transportproteine auf Einzelzellebene, andererseits erlauben sie, durch Cofärbungen Aussagen über deren segmentale Lokalisation zu treffen (s. Abb. 4.3 - 4.7, rechts).

NKCC2. NKCC2 (s. Abb. 4.3) wurde bereits in der neonatalen Niere stark exprimiert. Zu diesem Zeitpunkt war der Cotransporter in den zentralen Anteilen und in der inneren Rinde nachweisbar. Binnen der ersten Lebenswochen zog sich der Transporter aus den innermedullären

Bereichen zurück, so dass sich ab pp14 eine scharfe Grenze zwischen der Innen- und Außenzone des Nierenmarks demarkierte – entsprechend dem Übergang von der dünnen in die dicke aufsteigende Henle-Schleife. Die Verschiebung des NKCC2 illustriert demnach die postnatale Zonierung, wie sie im Kap. 4.1.2.1 diskutiert wird.

NCC. Für NCC (s. Abb. 4.4) ließ sich eine klare positive Korrelation zwischen Alter und Expression zeigen: Während der DCT-charakteristische Transporter in der neonatalen Niere nur spärlich exprimiert wurde, war er in späteren Entwicklungsstufen mit hoher Dichte und Intensität nachweisbar. Dieses Phänomen gibt uns den wichtigen Hinweis, dass das distale Konvolut in sehr jungen Mäusen noch vergleichsweise unterentwickelt ist.

AQP2. AQP2 (s. Abb. 4.5) wurde ähnlich wie NKCC2 von Geburt an in großem Maße exprimiert. Die Übersichtsaufnahmen (s. Abb. 4.5, links) verdeutlichen, dass die Nephrogenese bei Geburt noch längst nicht abgeschlossen war, da die Anzahl der Sammelrohre postnatal um ein Vielfaches zunahm. Anhand der Detailaufnahmen (s. Abb. 4.5, rechts) lässt sich mit zunehmendem Alter der Tiere die Polarisierung der Epithelzellen und vor allem der ADH-abhängige Einbau der Wasserkanäle AQP2 in die luminale Zellmembran nachvollziehen.

KCNJ10 und KCNJ16. Die beiden basolateralen Kaliumkanäle KCNJ10 und KCNJ16 (s. Abb. 4.6 und 4.7) wiesen über alle Alterstufen ein vergleichbares Verteilungsmuster auf, was die Annahme bzgl. der Heteromerbildung von KCNJ10 und KCNJ16 in der Niere (s. Kap. 1.5.1, 4.3 und 4.4) stützt. In den Übersichtsbildern überlappten sich die Expressionszonen des NCC und der Kaliumkanäle teilweise (s. Abb. 4.4, 4.6 und 4.7, links), woraus auf deren Coexpression im DCT zu schließen ist.

In den Detailaufnahmen (s. Abb. 4.6 und 4.7, rechts) detektierten wir KCNJ10 und KCNJ16 am basolateralen Pol von AQP2-positiven und AQP2-negativen Zellen des distalen Nephrons.

Beides zusammen weist darauf hin, dass KCNJ10 und KCNJ16 bereits von Geburt an im distalen Konvolut, im Verbindungstubulus und im kortikalen Sammelrohr exprimiert werden.

Unter Berücksichtigung der Zeitachse wird innerhalb der ersten 14 Tage eine Zunahme der Kanalexpression evident, ähnlich wie wir es für den NCC gesehen hatten. Gleichzeitig beobachteten wir auf zellulärer Ebene eine allmähliche Verdichtung der KCNJ10- und KCNJ16-spezifischen Immunreaktivität in der basolateralen Zelldomäne. Letzteres illustriert die voranschreitende Ausdifferenzierung der Zellpolarität, insbesondere die Entstehung der basolateralen Invaginationen in der transportaktiven Epithelzelle des distalen Konvoluts.

Renale Expression von NKCC2 in einer 1, 7, 14 und 56 Tage alten Maus

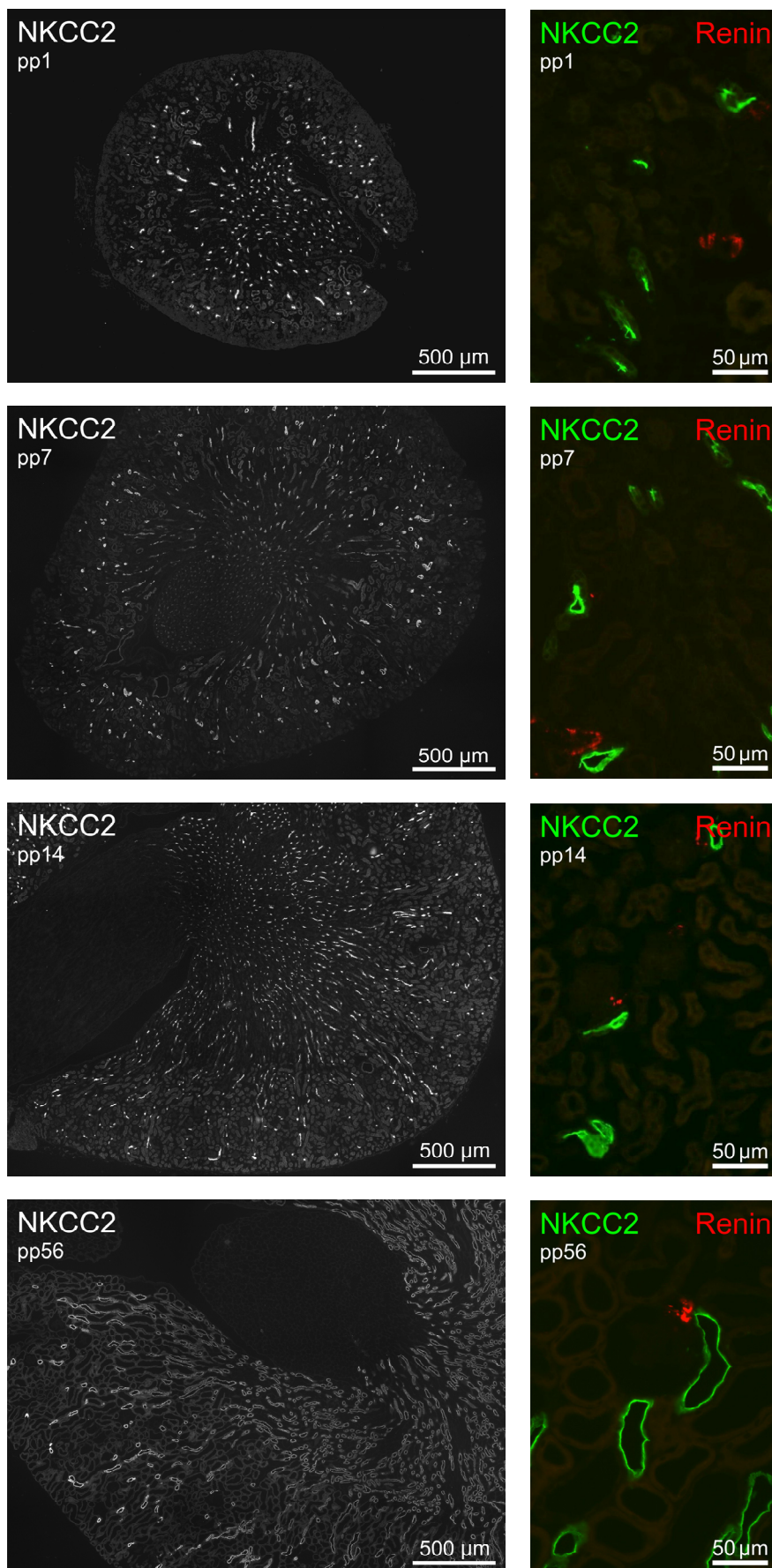


Abb. 4.3:
Expression des
Natrium-Kalium-
Chlorid-Cotranspor-
ters NKCC2
in der Niere einer
C57BL/6 Wildtyp-
Maus zum Zeitpunkt
pp1, pp7, pp14 und
pp56.

Links: Verteilung des
NKCC2 im Gesamt-
organ Niere.

Rechts: Cofärbung
von NKCC2 und Re-
nin. Renin markiert das
Polkissen des Glome-
rulus und zeigt des-
sen Nähe zur NKCC2-
exprimierenden TAL,
im engeren Sinne zur
Macula densa.

Renale Expression von NCC in einer 1, 7, 14 und 56 Tage alten Maus

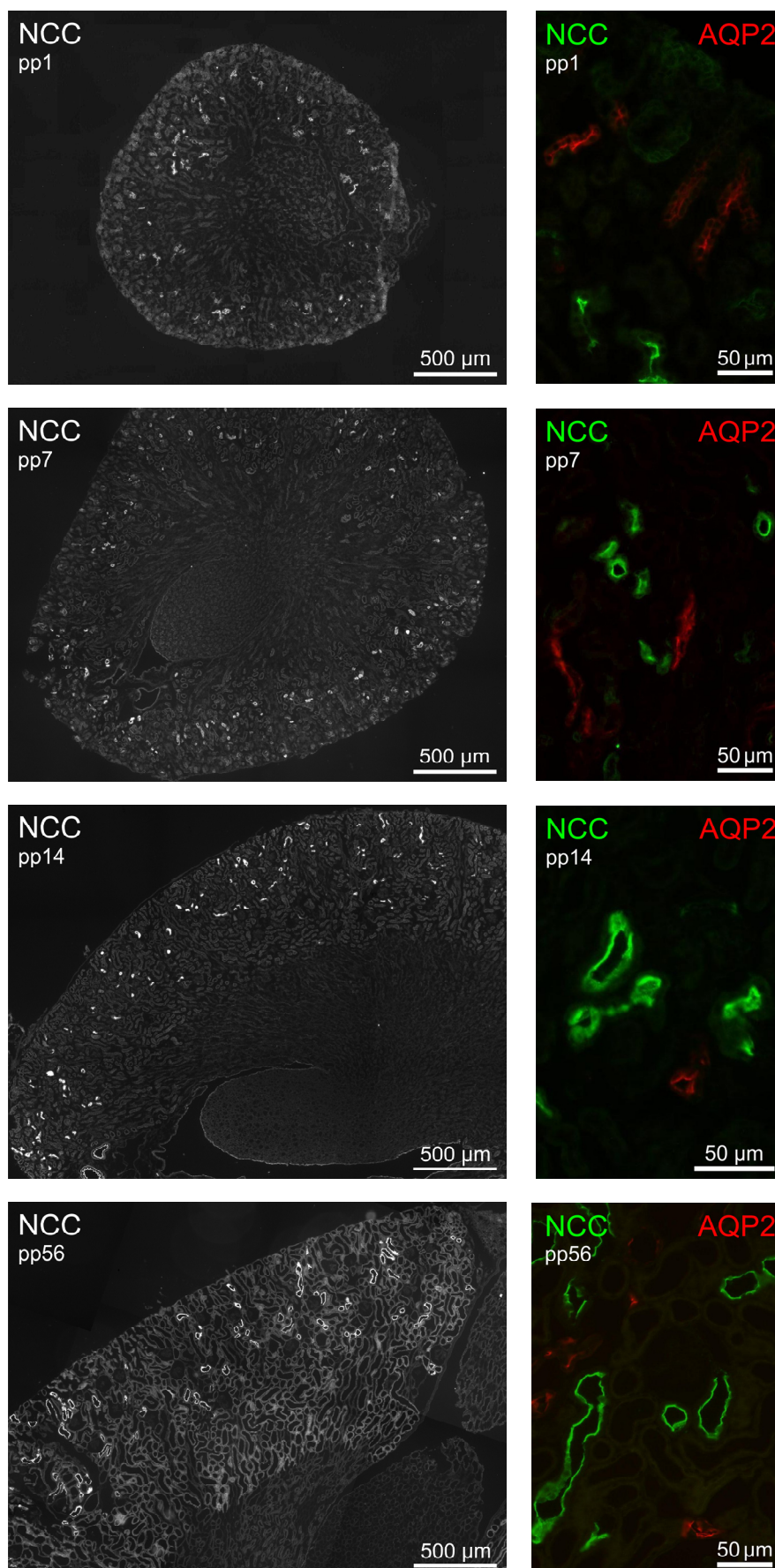


Abb. 4.4:
Expression des
Natrium-Chlorid-
Cotransporters NCC
in der Niere einer
C57BL/6 Wildtyp-
Maus zum Zeitpunkt
pp1, pp7, pp14 und
pp56.

Links: Verteilung des
NCC im Gesamtorgan
Niere.

Rechts: Cofärbung
von NCC und Aquapo-
rin 2 (AQP2), einem
Lokalisationsmarker
der Hauptzellen des
Sammelrohrs.
Die fehlende Überlap-
pfung der beiden Prote-
ine verdeutlicht die
strikt getrennte Lokali-
sation: NCC im DCT,
AQP2 im Sammelrohr.

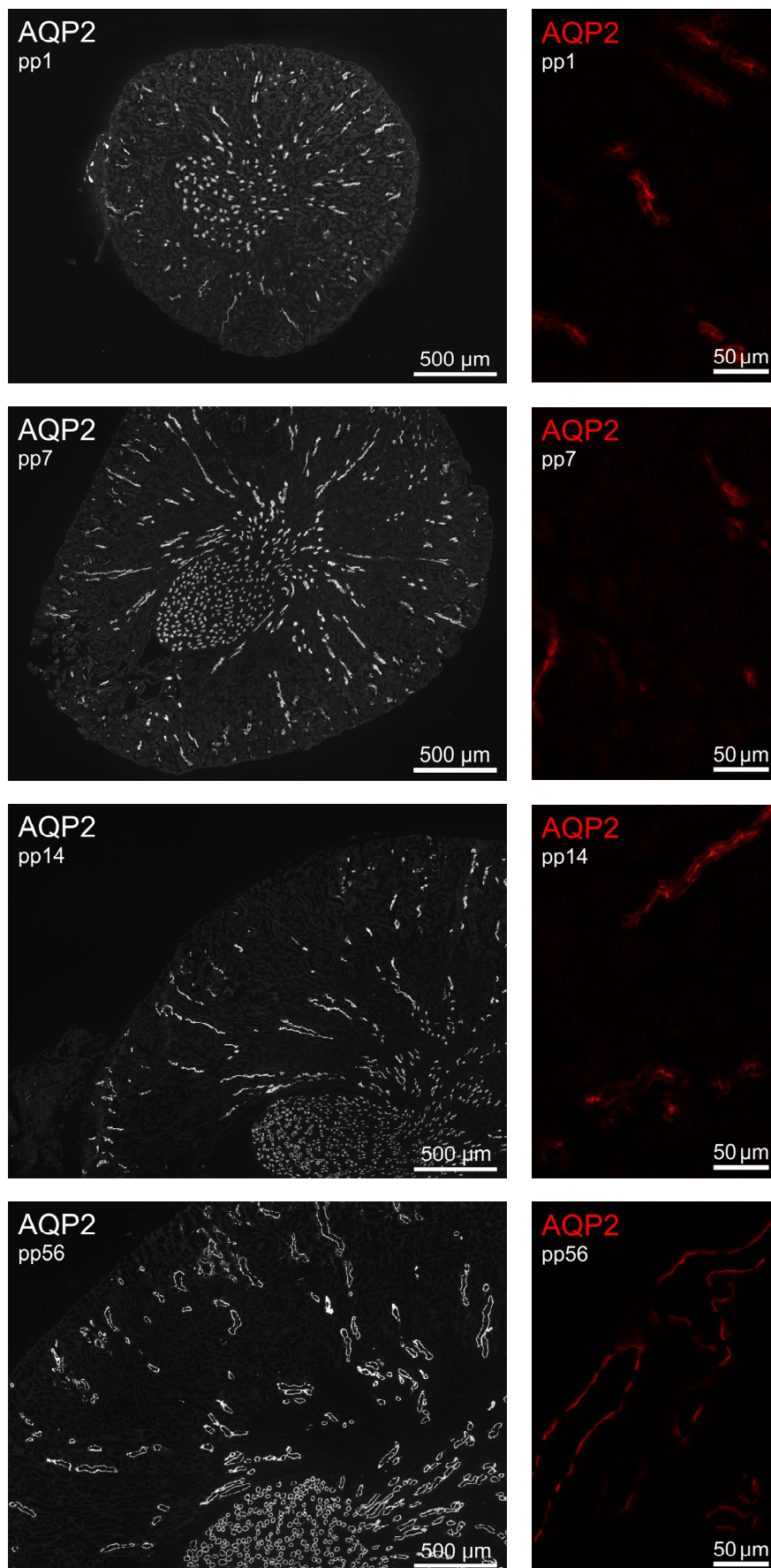
Renale Expression von AQP2 in einer 1, 7, 14 und 56 Tage alten Maus

Abb. 4.5:
Expression des
ADH-sensitiven
Wasserkanals
Aquaporin 2 (AQP2)
in der Niere einer
C57BL/6 Wildtyp-
Maus zum Zeitpunkt
pp1, pp7, pp14 und
pp56.

Links: Verteilung des
AQP2 im Gesamtorgan
Niere.

Rechts: AQP2-
Expression in der
luminalen Domäne der
Hauptzellen des Sam-
melrohrs.

Renale Expression von KCNJ10 in einer 1, 7, 14 und 56 Tage alten Maus

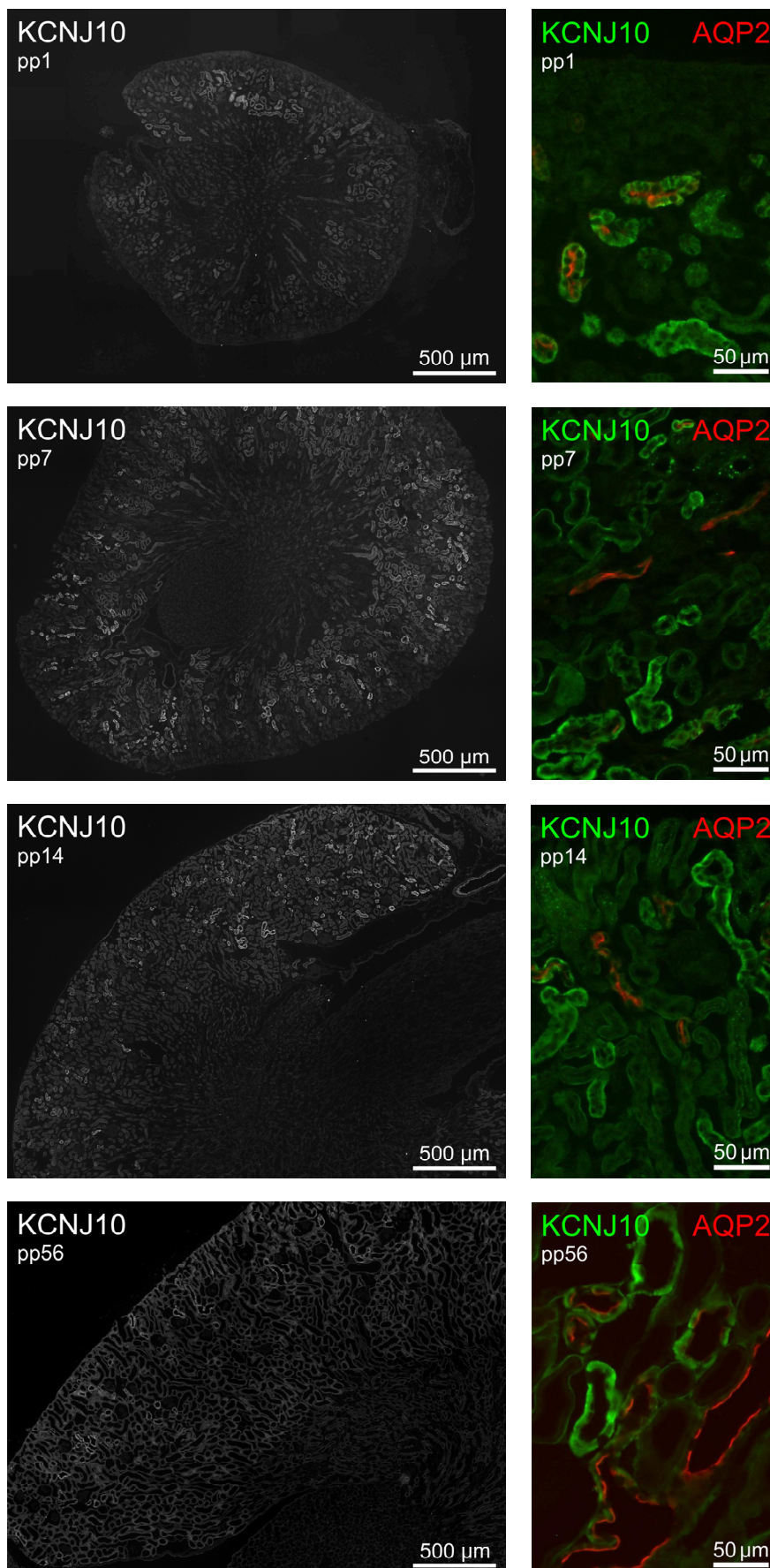


Abb. 4.6: Expression des einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanals KCNJ10 in der Niere einer C57BL6 Wildtyp-Maus zum Zeitpunkt pp1, pp7, pp14 und pp56.

Links: Verteilung des KCNJ10 im Gesamtorgan Niere.

Rechts: Cofärbung von KCNJ10 und Aquaporin 2 (AQP2), einem Lokalisationsmarker der Hauptzellen des Sammelrohrs. Die partielle Überlappung der beiden Proteine zeigt, dass KCNJ10 sowohl im Sammelrohr als auch in den davon proximalen Tubulussegmenten exprimiert wird.

Renale Expression von KCNJ16 in einer 1, 7, 14 und 56 Tage alten Maus

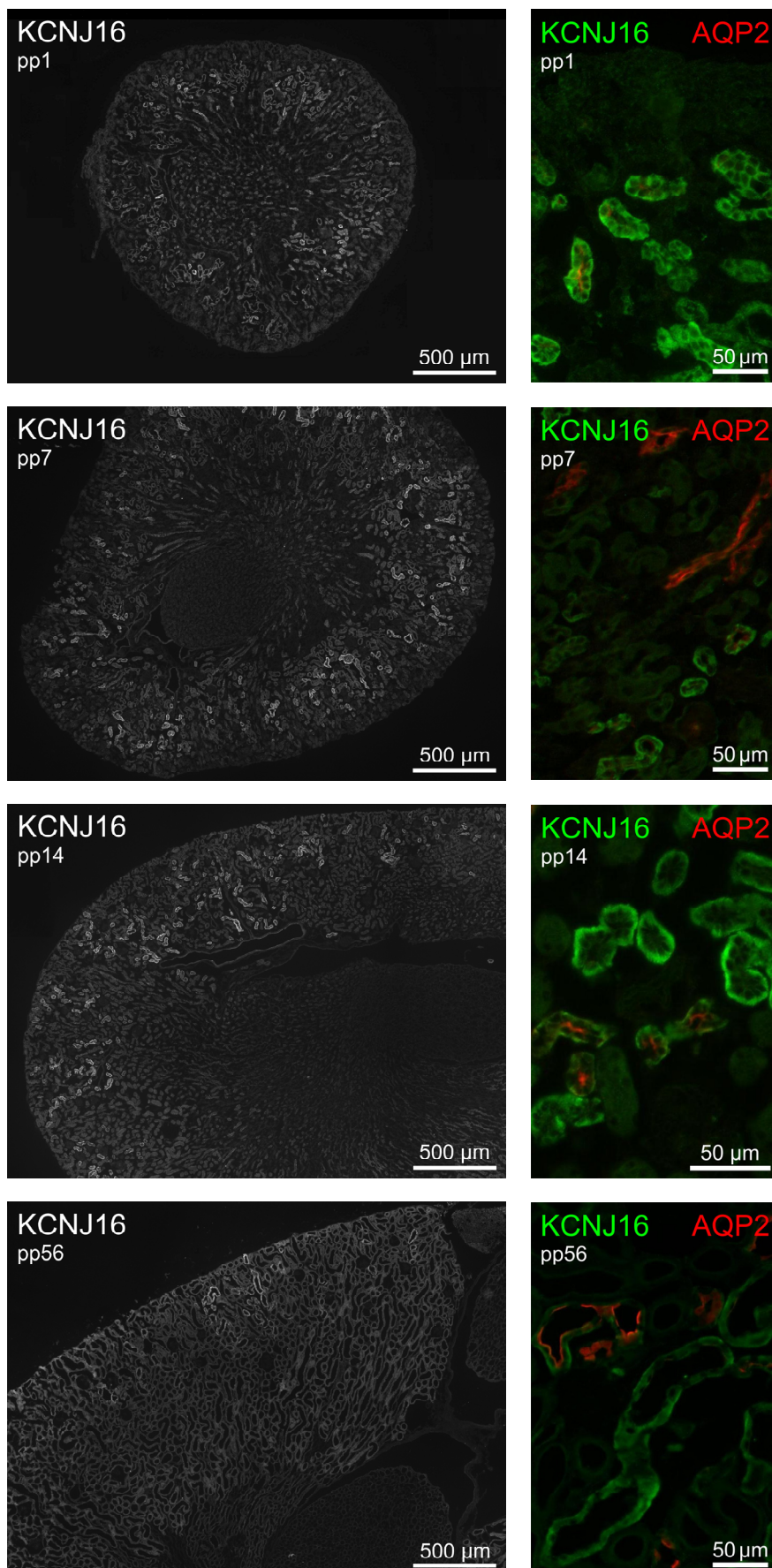


Abb. 4.7:
Expression des
einwärtsgleichrich-
tenden Kaliumkanals
KCNJ16
in der Niere einer
C57BL/6 Wildtyp-
Maus zum Zeitpunkt
pp1, pp7, pp14 und
pp56.

Links: Verteilung des
KCNJ16 im Gesamt-
organ Niere.

Rechts: Cofärbung
von KCNJ16 und
Aquaporin 2 (AQP2),
einem Lokalisations-
marker der Hauptzel-
len des Sammelrohrs.
Ähnlich wie KCNJ10
zeigt auch KCNJ16
eine partielle Überlap-
pung mit AQP2 und
damit die Lokalisation
im Sammelrohr und
der davon proximalen
Tubulussegmente.

4.1.3 Renale Ausscheidungsfunktion: Kreatinin und Kationen

Neben den entwicklungsabhängigen Veränderungen der Morphologie und der Transportproteinexpression der Niere galt unser Interesse der renalen Ausscheidungsfunktion, hier im Besonderen der Ausscheidung des Kreatinins und der Elektrolyte Kalium, Natrium, Calcium und Magnesium.

Zu diesem Zwecke asservierte ich Urinproben von Tieren im Alter zwischen 1 und 84 Tagen. Die Quantifizierung der Ionen erfolgte mittels Atomabsorptionsspektroskopie. Die Kreatininkonzentration wurde durch ein enzymatisch-photometrisches Messverfahren (Jaffé-Reaktion) bestimmt.

4.1.3.1 Kreatinin

Kreatinin (Molekülgröße 113 Da) wird als ein Endprodukt des muskulären Energiestoffwechsels (zumindest beim Erwachsenen) glomerulär frei filtriert, tubulär kaum sezerniert und nicht resorbiert. Dem zufolge wird die filtrierte Menge auch mit dem Urin ausgeschieden. Somit gilt bei konstanter glomerulärer Filtrationsfunktion bekanntermaßen die direkte Abhängigkeit zwischen der Kreatininkonzentration des Endharns und der Wasserresorption im Sammelrohr, i.e. Konzentrierung des Urins. Dank dieses Umstands lassen sich Aussagen über die Ausscheidung weiterer Stoffe unabhängig von der Harnkonzentrierung treffen, indem man die Konzentration dieser Stoffe durch die Kreatininkonzentration des Endharns dividiert.

In unseren Untersuchungen zeigte die Kreatininkonzentration im Urin eine positive Korrelation mit dem Alter der Tiere (s. Abb. 4.8). Ausgehend von $0,65 \pm 0,02$ mM bei Neonaten stieg die Kreatininkonzentration binnen der 1. Lebenswoche bis $1,24 \pm 0,18$ mM an, in der 2. Woche bis $2,18 \pm 0,32$ mM. Zwischen pp15 und pp35 war neben der kontinuierlichen Konzentrationszunahme bis maximal $6,31 \pm 0,93$ mM (pp32) eine erhebliche intra- und interindividuelle Schwankung der Kreatininausscheidung zu verzeichnen. Erst am Ende des zweiten Lebensmonats nivellierten sich die Mittelwerte um 4,3 mM ($3,84 \pm 0,59$ mM bis $4,72 \pm 0,42$ mM).

4.1.3.2 Kationen

Zu den wichtigsten Kationen des Säugetierorganismus zählen Kalium, Natrium, Calcium und Magnesium. Die Aufrechterhaltung des homöostatischen Gleichgewichts repräsentiert eine zentrale Aufgabe, welche sich ab Geburt stellt und pränatal größtenteils vom maternalen Organismus übernommen wird. Die Regulation erfolgt in Abhängigkeit von exogener Zufuhr (Nahrung) und endogenen Verschiebungen (z.B. Calciumeinbau in Knochen, Kaliumfreisetzung bei Zelluntergang, Kaliumverbrauch bei Zellproliferation) im Wesentlichen über die Niere und den Darm – gesteuert von einem komplexen endokrinen System.

Die Zusammenschau der Elektrolytausscheidung der heranwachsenden C57BL6-Mäuse legt eine Unterteilung der Zeitachse in drei Phasen nahe (s. Abb. 4.8):

- pp1 - pp14
- pp15 - pp35
- pp36 - pp84

pp1 - pp14:

Die Absolutkonzentrationen aller vier Elektrolyte im Endharn rangierten in den ersten beiden Lebenswochen, bezogen auf den gesamten Beobachtungszeitraum, auf dem niedrigsten Niveau: Der Kaliumgehalt schwankte zwischen $87,51 \pm 4,85$ mM und $125,85 \pm 3,09$ mM. Die Natriumausscheidung fiel von $52,20 \pm 6,21$ mM post partum rapide auf Werte deutlich unter 10 mM (Minimum: $3,13 \pm 1,33$ mM an pp6) ab. Calcium zeigte zunächst einen Anstieg bis auf $1,47 \pm 0,31$ mM, pendelte sich dann auf niedrige Werte um 0,75 mM ein. Die Magnesiumkonzentration stieg von $2,48 \pm 0,21$ mM auf maximal $13,25 \pm 1,42$ mM an, blieb jedoch genauso wie für K^+ , Na^+ und Ca^{2+} niedriger als die Messdaten der adoleszenten und adulten Tiere.

Bezogen auf die Kreatininkonzentration verändert sich das Bild: Mit Ausnahme von Magnesium erlangte die Kationenausscheidung initial ihre Maximalwerte; sie reduzierte sich aber mehr oder minder rasch, um im Verlauf der ersten beiden Lebenswochen den globalen Tiefstand anzunehmen ($K^+/Krea$: $186,31 \pm 7,68$ nach $44,58 \pm 2,81$; $Na^+/Krea$: $85,10 \pm 12,00$ nach $2,12 \pm 0,54$; $Ca^{2+}/Krea$: $1,55 \pm 0,34$ nach $0,37 \pm 0,03$ [mM]/[mM]). Auch Magnesium/Kreatinin sank gegen Ende der 2. Lebenswoche auf einen sehr niedrigen Wert ($4,61 \pm 0,28$ mM/mM), der allerdings von der Konzentration der Neonaten ($3,79 \pm 0,33$ mM/mM) unterschritten wurde.

pp15 - pp35:

Nach einem drastischen Anstieg während der 3. und 4. Lebenswoche nahm die absolute Ausscheidung von Kalium, Natrium, Calcium und Magnesium hier ihre Maxima an (K^+ $543,53 \pm 33,64$; Na^+ $162,97 \pm 27,79$; Ca^{2+} $6,83 \pm 2,27$; Mg^{2+} $64,03 \pm 11,11$ [mM]). Ähnliches gilt für die korrigierten Daten ([Ion]/[Krea]).

Kennzeichnend für diese Phase waren die sprunghaften Veränderungen zwischen den einzelnen Messzeitpunkten sowie die ausgeprägte interindividuelle Streuung (große SEM).

pp40 - pp84:

Analog zur Kreatininkonzentration im Endharn stabilisierten sich der absolute und relative Elektrolytgehalt im Urin: K^+ 230 - 330; Na^+ 80 - 100; Ca^{2+} 2 - 3; Mg^{2+} 20 - 40 [mM]; $K^+/Krea$ 60 - 80; $Na^+/Krea$ 15 - 30; $Ca^{2+}/Krea$ 0,4 - 0,7; $Mg^{2+}/Krea$ 5 - 9 [mM]/[mM].

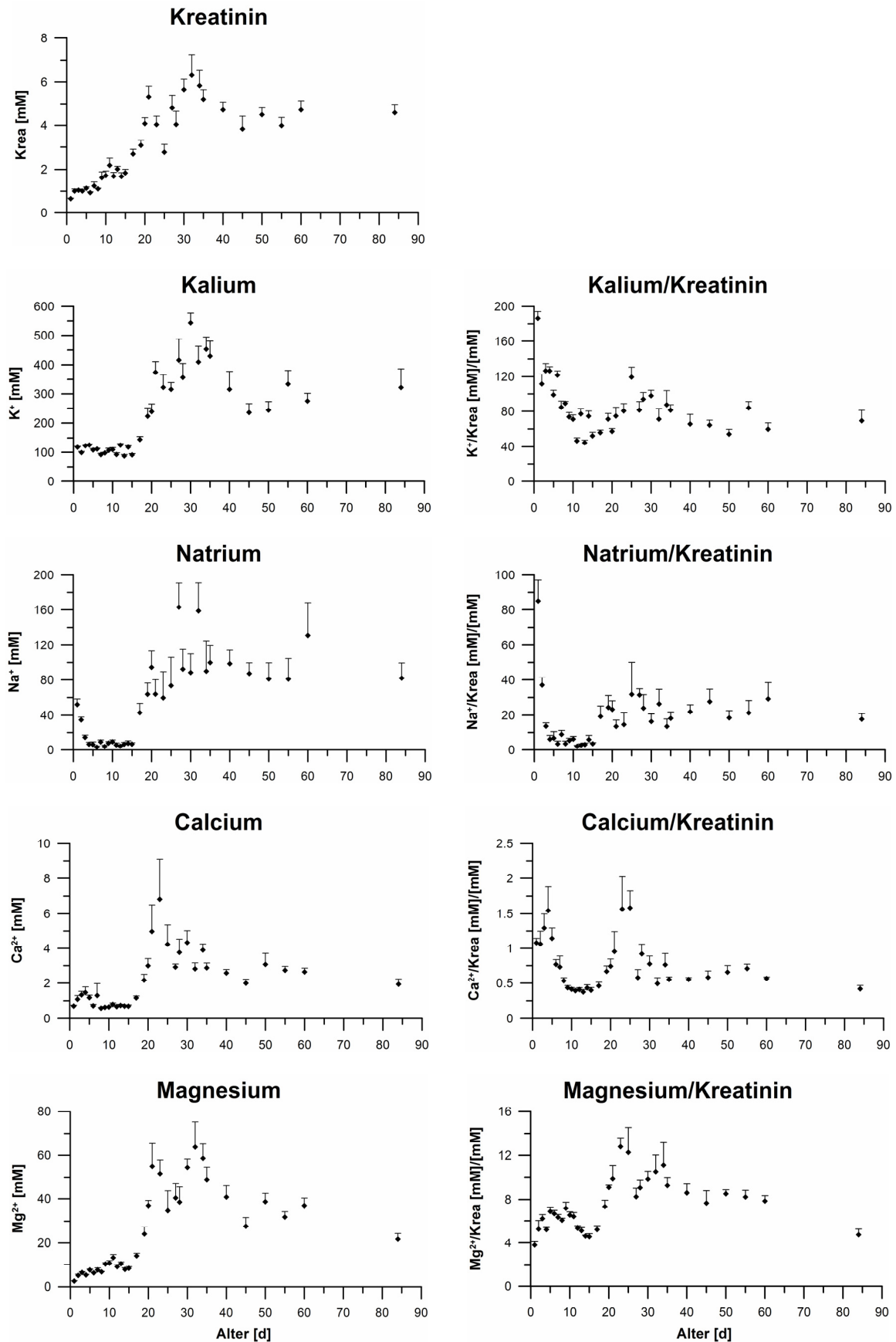


Abb. 4.8: Renale Ausscheidungsfunktion von C57BL6 Wildtyp-Mäusen während der ersten drei Lebensmonate. Dargestellt sind die Mittelwerte (mit SEM) der Kreatinin- bzw. Elektrolytkonzentrationen im Urin, gemittelt über alle Tiere zu den jeweiligen Messzeitpunkten. [pp1-7 n=7-26, pp8-14 n=6-24, pp15-21 n=6-20, pp22-28 n=4-11, pp29-59 n=6-11, pp60-84 n=5].

4.2 Renaler Phänotyp der KCNJ10-Knockout-Maus

KCNJ10 codiert einen Kaliumkanal, der insbesondere in der Niere exprimiert wird. Um die Auswirkungen der Gendeletion KCNJ10(-/-) auf den Gesamtorganismus und speziell die Nierenfunktion während der postnatalen Entwicklung zu erfassen, untersuchte ich das Körperwachstum sowie die Kreatinin- und Kationenausscheidung von heranwachsenden KCNJ10-Knockout-Mäusen des Stammes SV129 über 10 Tage hinweg.

Als Kontrolle fungierten die gesunden Geschwister der Knockout-Mäuse, also Tiere vom Genotyp „Wildtyp“ oder „heterozygot“. Jede der drei Versuchsgruppen – Wildtyp (WT), heterozygot-knockout (HE), homozygot-knockout (KO) – umfasste fünf Individuen.

4.2.1 Überleben und Körperwachstum – Wildtypen, Heterozygote und Knockouts

Die gesunden Tiere mit einem durchschnittlichen Geburtsgewicht von $1,47 \pm 0,05$ g (WT) und $1,46 \pm 0,02$ g (HE) zeigten in den ersten beiden Lebenswochen eine stetige Gewichtszunahme von ca. 0,4 g pro Tag. Zwischen den beiden Genotypen WT und HE waren keine merklichen Unterschiede zu verzeichnen.

Anders verhielt es sich mit den Knockout-Tieren: Zum Zeitpunkt der Geburt waren sie mit $1,50 \pm 0,02$ g ähnlich schwer wie ihre Altersgenossen, nahmen aber im Verlauf nicht adäquat an Gewicht zu (s. Abb. 4.9).

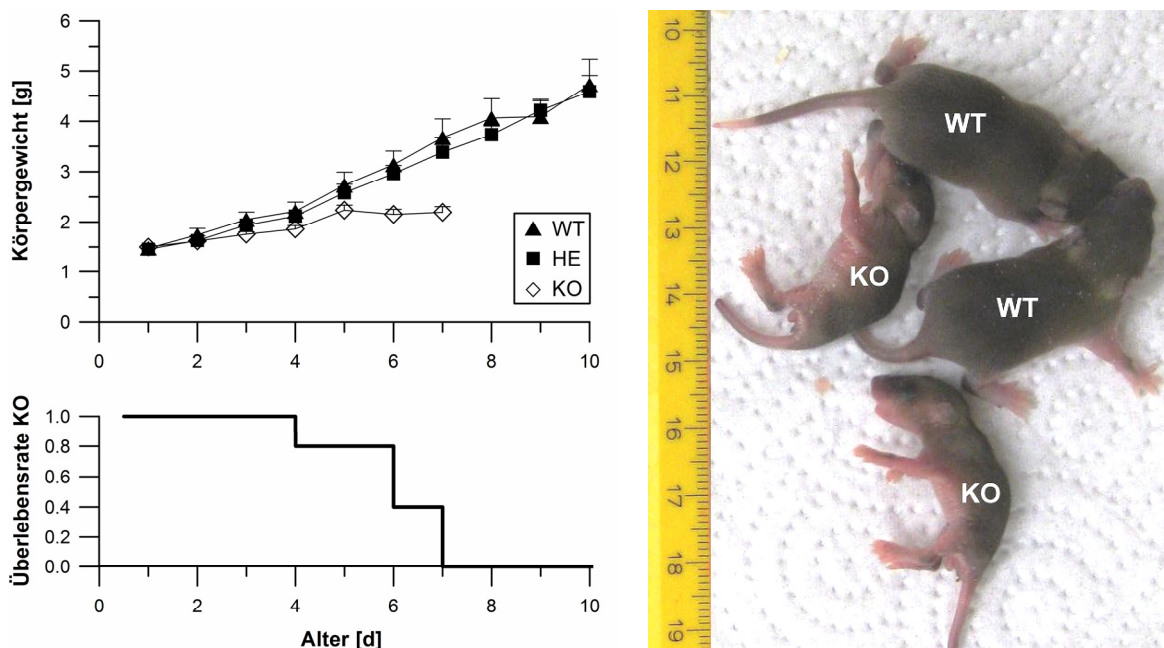


Abb. 4.9: Körperwachstum und Überleben von SV129 Mäusen des Genotyps Wildtyp (WT), heterozygot-KCNJ10-knockout (HE) und homozygot-KCNJ10-knockout (KO) während der ersten zehn Lebensstage. *Links:* Dargestellt sind die Mittelwerte (mit SEM) des Körpergewichts (oben) und die Überlebenskurve der Knockoutmäuse (unten) [Für WT und HE: n=5; für KO: pp1-4 n=5, pp5-6 n=4, pp7 n=2]. *Rechts:* WT- und KO-Mäuse aus einem Wurf an pp7.

Alle Knockout-Tiere verstarben innerhalb der ersten Lebenswoche: ein Tier an pp5, je zwei Tiere an pp7 und pp8. Die durchschnittliche Überlebenszeit von 7 Tagen unterstreicht die Bedeutsamkeit des betroffenen Gens bzw. dessen Genprodukts.

Jedoch kann an dieser Stelle keine Aussage über die exakte Todesursache der Knockout-Mäuse getroffen werden. Denn wir wissen nicht, ob die Tiere aufgrund der metabolischen Entgleisung, aufgrund eines zentralnervösen Versagens oder infolge uns noch unbekannter Ursachen versterben. Aufklärung könnte ein partieller nierenspezifischer Knockout bringen (s. Kap. 5.2).

4.2.2 Morphologie einer KCNJ10-Knockout-Niere

Bei der feingeweblichen Untersuchung der Nieren von jungen KCNJ10-Knockout-Mäusen fiel nicht nur auf, dass die Organe, genauso wie die Tiere insgesamt (s. Abb. 4.9), für ihr Alter zu klein waren. Auch die Binnenstruktur der Knockout-Niere war gegenüber der des Wildtyp-Organs deutlich verändert (s. Abb. 4.10). Ein sehr schmaler und wenig differenzierter Kortex, eine nur rudimentär ausgebildete Papille und ein massiv dilatiertes Nierenbecken kennzeichneten die Nieren der Knockout-Tiere.

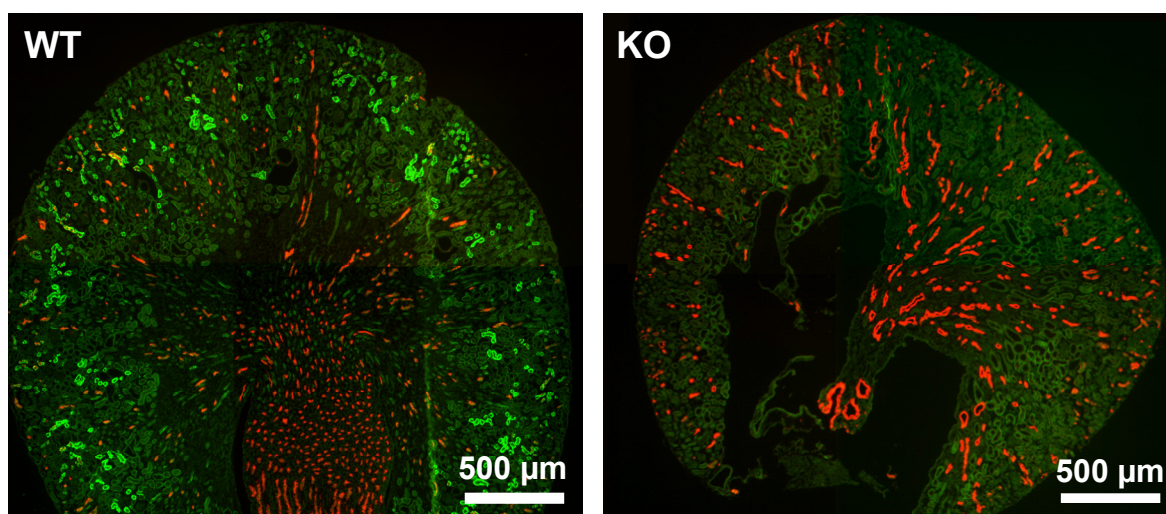


Abb. 4.10: Morphologie einer 7 Tage alten Wildtyp(WT)- und KCNJ10-Knockout(KO)-Mauseniere. Immunfluoreszenz-Färbung von Aquaporin 2 (AQP2, rot) und KCNJ10 (grün). Das Organ der Knockout-Maus zeigt eine schwer deformierte Binnenstruktur: schmaler Kortex, verkümmerte Papille, dilatiertes Nierenbecken. Außerdem demonstriert diese Färbung die Spezifität des anti-KCNJ10-Antikörpers. (Die abgebildeten IF-Schnitte wurden mir freundlicherweise von S. Bandulik zur Verfügung gestellt.)

4.2.3 Renale Ausscheidungsfunktion – Wildtypen, Heterozygote und Knockouts

Die Gegenüberstellung der Ausscheidungsdaten (s. Abb. 4.11 und Abb. 5.2) zeigt – wie auch das Körperwachstum, das Überleben und die Nierenmorphologie – deutliche Abweichungen zwischen den Genotypen: Während sich WT und HE nur geringfügig unterschieden, wichen die KO-Tiere bei einigen Parametern deutlich von der Norm ab.

Auffällig war, dass sich die Unterschiede zwischen den Genotypen erst im Verlauf der ersten Lebenswoche herausbildeten, d.h. dass die gemessenen Kreatinin- und Elektrolyt-Konzentrationen im Urin zum Zeitpunkt der Geburt für alle drei Genotypen ähnlich waren.

4.2.3.1 Kreatinin

Die Harnkonzentrierungsfähigkeit, evident an der Kreatininkonzentration des Urins, stieg bei den gesunden Tieren (WT, HE) in der neonatalen Periode (pp1 - pp5) um das Dreifache von $0,55 \pm 0,04$ mM (WT) bzw. $0,59 \pm 0,02$ mM (HE) auf $1,64 \pm 0,30$ mM (WT) bzw. $1,44 \pm 0,19$ mM (HE) an. Auch die KO-Tiere zeigten diese Tendenz, jedoch in Ausmaß und Geschwindigkeit deutlich schwächer (von $0,42 \pm 0,05$ mM auf $1,05 \pm 0,31$ mM).

4.2.3.2 Kationen

Kalium. Die absolute K^+ -Konzentration im Urin schwankte bei allen Tieren in den ersten Lebenstagen zwischen 52 und 93 mM, wobei kein Unterschied zwischen den Genotypen vorlag. Nach Korrektur (Division durch die Kreatininkonzentration) beobachteten wir allerdings eine erhöhte K^+ -Ausscheidung bei den Knockout-Tieren (pp1: $150,40 \pm 5,09$ (KO) versus $99,61 \pm 22,27$ (WT) und $99,43 \pm 11,76$ (HE); pp5: $87,54 \pm 27,62$ (KO) versus $45,89 \pm 6,51$ (WT) und $54,21 \pm 9,53$ (HE) [mM/mM]).

Natrium. Bei Na^+ zeigten alle drei Genotypen gleichermaßen einen postnatalen Abfall der absoluten und relativen Konzentration, ohne für eine Gruppe einen eindeutigen Trend erkennen zu lassen (Absolut pp1: $60,30 \pm 9,42$ (WT), $46,61 \pm 12,42$ (HE), $39,25 \pm 5,09$ (KO); pp5: $10,82 \pm 3,44$ (WT), $5,99 \pm 2,16$ (HE), $9,00 \pm 2,47$ (KO) [mM]. Bezogen auf Kreatinin pp: $108,96 \pm 10,75$ (WT), $77,78 \pm 19,11$ (HE), $91,84 \pm 6,55$ (KO); pp5: $6,18 \pm 1,78$ (WT), $4,27 \pm 1,76$ (HE), $10,64 \pm 4,73$ (KO) [mM]/[mM]).

Calcium und Magnesium. Für die zweiwertigen Ionen Ca^{2+} und Mg^{2+} verzeichneten wir signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen. Die Knockouts schieden absolut und relativ weniger Ca^{2+} aus. Während die gesunden Tiere in den ersten Lebenstagen eine Ca^{2+} -Konzentration von bis zu $2,74 \pm 0,70$ mM (WT) bzw. $2,54 \pm 0,67$ mM (HE) erzielten, erlangten die Knockouts maximal Werte von $0,61 \pm 0,07$ mM (alle Werte zum Zeitpunkt pp5). Auch die Mg^{2+} -Ausscheidung der Knockouts war deutlich niedriger, wobei sich die Unterschiede zwischen den Genotypen genauso wie für Ca^{2+} erst im Verlauf der ersten Lebenswoche abzeichneten (pp5: $11,98 \pm 0,98$ (WT), $9,88 \pm 1,52$ (HE), $5,22 \pm 0,59$ (KO) [mM]).

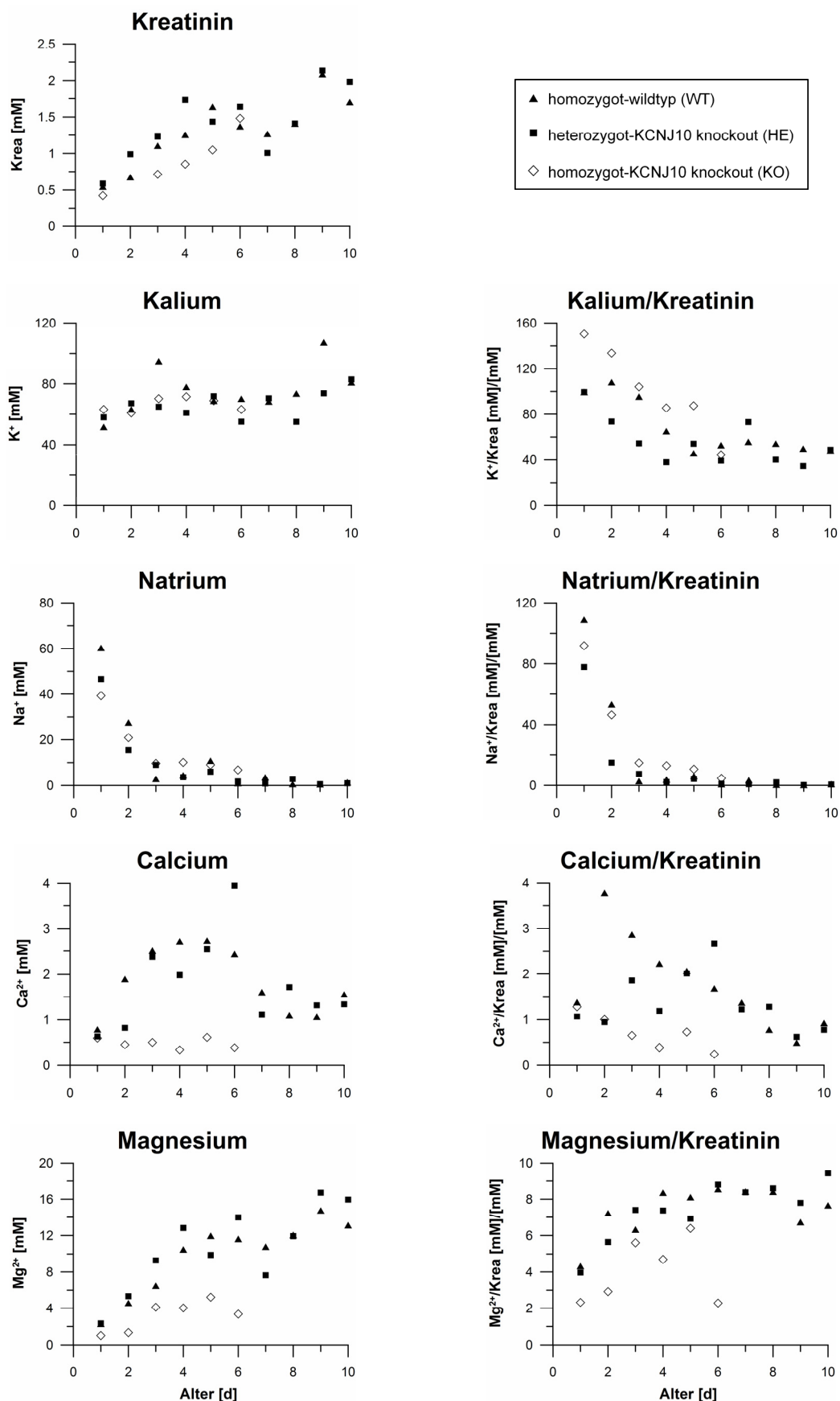


Abb. 4.11: Renale Ausscheidungsfunktion von SV129 Mäusen des Genotyps Wildtyp (WT), heterozygot-KCNJ10-knockout (HE) und homozygot-KCNJ10-knockout während der ersten zehn Lebenstage. Dargestellt sind die Mittelwerte der Kreatinin- bzw. Elektrolytkonzentrationen, gemittelt über alle Tiere zu den jeweiligen Messzeitpunkten [WT: n=3-5, HE: n=2-5, KO: n=3-5].

4.3 Elektrophysiologie – hKCNJ10, hKCNJ16 und die Mutation hKCNJ10 R65P

Die einwärtsgerichteten Kaliumkanäle KCNJ10 (Kir4.1) und KCNJ16 (Kir5.1) repräsentieren wichtige Kaliumkanäle des basolateralen distalen Konvoluts, Verbindungsstücks und kortikalen Sammelrohrs [38, 40]. Im hochaktiven Transportepithel des distalen Nephrons tragen diese basolateral gelegenen Kanäle vermutlich als Heterotetramere maßgeblich zur Hyperpolarisation der Epithelzelle und zum „pump-leak-coupling“ bei (s. Kap. 1.4 und 1.5).

Bei EAST/SeSAME-Patienten wurden in den letzten fünf Jahren mehrere Mutationen des KCNJ10 identifiziert, die bei homozygotem bzw. compound-heterozygotem Genotyp zu Hypokaliämie, metabolischer Alkalose, Hypomagnesiämie und Hypocalciurie führen (s. Kap. 1.7). Von den 14 bis dato (Ende 2013) bekannten EAST/SeSAME-Mutationen (s. Abb. 1.5 C) soll in dieser Arbeit die Missense-Mutation c.G194C (entspricht p.R65P, kurz R65P) in ihrem elektrophysiologischen Verhalten beleuchtet werden.

Da wir uns letztlich für die mutationsbedingte Beeinträchtigung der Nierenfunktion *in vivo* interessierten, verglichen wir nicht nur den mutierten homomeren Kanal hKCNJ10 R65P mit dem homomeren hKCNJ10 WT, sondern überprüften auch die Effekte der Mutation auf die Funktion des Heteromers hKCNJ10/hKCNJ16 – also die Kanalfunktion, wie sie mutmaßlich in den renalen Tubuli vorliegt.

Hierfür wurden die Kanäle hKCNJ10 WT, hKCNJ10 R65P und hKCNJ16 heterolog in Säugertierzellen des Typs CHO (Chinese Hamster Ovary) und HEK293 (Human Embryonic Kidney) exprimiert und anschließend mithilfe verschiedener Patch-Clamp-Experimente charakterisiert.

Im Folgenden werden die humanen Kaliumkanäle der Übersichtlichkeit wegen nicht als „hKCNJ“ sondern als „KCNJ“ oder „J“ bezeichnet.

4.3.1 Whole-cell-Experimente: Membranpotential und Barium-Effekt

Membranpotential

Das Membranpotential einer Zelle wird im Wesentlichen von zwei Faktoren bestimmt: von der Elektrolytverteilung zwischen Intra- und Extrazellularraum und von der Leitfähigkeit der Zellmembran für bestimmte Ionen. Unter unseren Experimentalbedingungen lag das Gleichgewichtspotential für K^+ bei ca. -90 mV, das für Cl^- bei ca. -35 mV und das für Na^+ und Ca^{2+} bei ca. +60 mV bzw. +120 mV. Je höher der Anteil einer bestimmten Ionenleitfähigkeit an der Gesamtzellleitfähigkeit ist, desto mehr wird das Membranpotential zum entsprechenden Gleichgewichtspotential hin verschoben. Da die transfizierten Zellen vorrangig Kaliumkanäle

exprimierten, kann das Membranpotential im Whole-cell-Modus als Surrogatparameter für die Kaliumkanalaktivität herangezogen werden.

In den KCNJ10 WT exprimierenden CHO-Zellen lag das Membranpotential mit durchschnittlich -85 mV nahe dem Kalium-Gleichgewichtspotential, was einer Hyperpolarisation von ca. 45 mV gegenüber den scheintransfizierten Kontrollzellen entsprach. Hyperpolarisiert waren auch jene Zellen, die mit der Mutante KCNJ10 R65P transfiziert waren, allerdings weniger stark als der Wildtyp (s. Abb. 4.12, obere Spur).

Unter den cotransfizierten Zellen zeigte nur KCNJ10 WT/KCNJ16 WT eine ausgeprägte Hyperpolarisation. Das Membranpotential der mit dem Heteromer KCNJ10 R65P/KCNJ16 WT transfizierten Zellen unterschied sich hingegen nicht signifikant von dem der scheintransfizierten Kontrollzellen. Auch KCNJ16 allein hyperpolarisierte die Zellen nicht (s. Abb. 4.12, obere Spur).

Barium-Effekt

Durch die Applikation von Barium werden die endogenen und exogenen Kaliumkanäle inhibiert. Dadurch wird das Membranpotential zu weniger negativen Werten verschoben und der transmembranöse Strom sinkt. Das Ausmaß dieses Effekts ist maßgeblich von der Anzahl der intakten und damit inhibierbaren Kaliumkanäle pro Zelle abhängig.

Bei den KCNJ10 WT und KCNJ10 R65P exprimierenden Zellen kam es nach der Zugabe von Barium, d.h. nach dem Austausch der Standard-Badlösung gegen eine bariumhaltige Badlösung (5 mM), zu einer drastischen Depolarisation des Membranpotentials um durchschnittlich 45 mV sowie zu einer deutlichen Reduktion des transmembranösen Stroms. Von den cotransfizierten Zellen unterschied sich lediglich KCNJ10 WT/KCNJ16 WT signifikant von der Kontrolle. Der Barium-Effekt in KCNJ16 exprimierenden Zellen war ebenfalls nicht signifikant verschieden (s. Abb. 4.12).

Diesen Experimenten zufolge besitzt die Mutante KCNJ10 R65P eine reduzierte, aber dennoch relevante Restfunktion. Durch die Heteromerbildung mit KCNJ16 wird das Defizit der Mutante nicht gemindert.

Interessanterweise wird die charakteristische Eigenschaft der hier besprochenen Kaliumkanäle, nämlich die Einwärtsgleichrichtung, bei Coexpression von KCNJ10 WT/KCNJ16 WT gegenüber dem Homomer KCNJ10 WT deutlich verstärkt (s. Abb. 4.12, untere Spur) – ein Phänomen, das bereits von Pessia et al. beschrieben wurde [48].

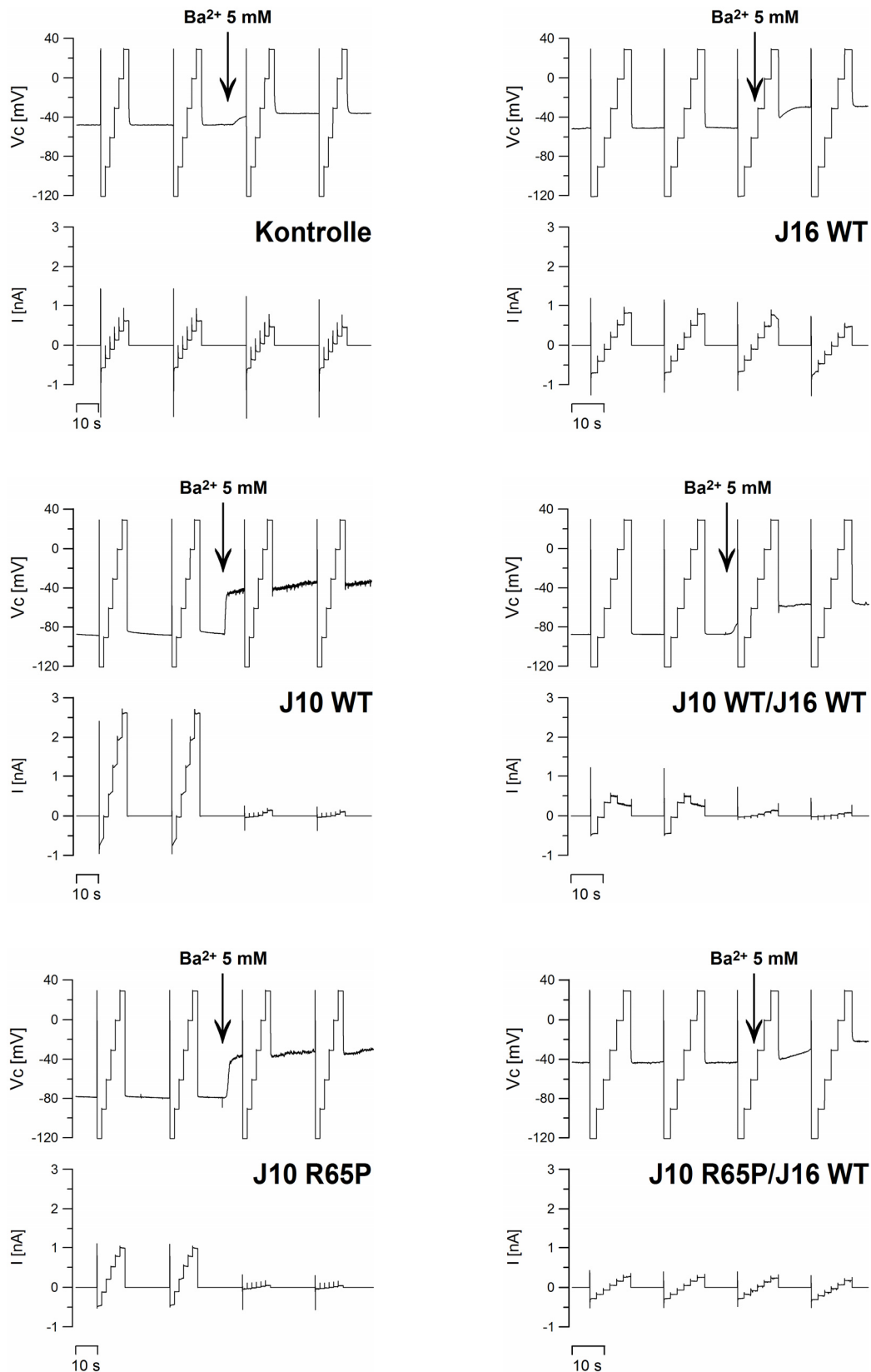


Abb. 4.12: Membranpotential, transmembranöser Strom und Barium-Effekt in transfizierten CHO-Zellen: KCNJ10 (J10) WT, KCNJ10 (J10) R65P und KCNJ16 (J16) WT als Mono- und Coexpression, scheintransfizierte Kontrollzellen (Originalexperimente). Dargestellt sind das Klemm- bzw. Membranpotential (V_c ; jeweils die oberen Spuren) sowie der Strom über die Plasmamembran (I ; jeweils die unteren Spuren) vor und nach der Applikation von Barium (Ba^{2+} 5mM). (Datenerhebung in Zusammenarbeit mit E. Humberg, geb. Lieberer)

4.3.2 Einzelkanal-Experimente: Einzelkanalstrom und Offenwahrscheinlichkeit

Die Charakterisierung der Wildtyp- und mutierten Proteine auf Einzelkanalebene erfolgte an HEK293-Zellen. Die im Cell-attached-Modus erhobenen Einzelkanalströme und Offenwahrscheinlichkeiten ließen klare Unterschiede zwischen KCNJ10 WT, KCNJ10 R65P und der jeweiligen Coexpression mit KCNJ16 WT erkennen (s. Abb. 4.13). KCNJ10 WT wies klar abgrenzbare Einzelkanal-Levels und eine hohe Offenwahrscheinlichkeit von 60 - 80% auf. Dem gegenüber waren für KCNJ10 R65P keine diskreten Levels erkennbar. Vielmehr verursachte diese Mutation ein „Flickern“ des Kanals mit einer deutlich reduzierten Offenwahrscheinlichkeit von 15 - 45%. Durch die Coexpression von KCNJ10 und KCNJ16 veränderte sich das Profil der Einzelkanalereignisse merklich: Neben einer variablen Einzelkanalamplitude beobachteten wir für KCNJ10 WT/KCNJ16 WT mindestens ein Sublevel. Während über KCNJ10 WT fast ununterbrochen Strom floss, öffnete KCNJ10 WT/KCNJ16 WT nur in Form vereinzelter „Bursts“. Dies resultierte in einer stark reduzierten Offenwahrscheinlichkeit. KCNJ10 R65P/KCNJ16 WT wies ebenfalls Sublevels auf, aber eine noch geringere Offenwahrscheinlichkeit als alle bisher beschriebenen Kanäle.

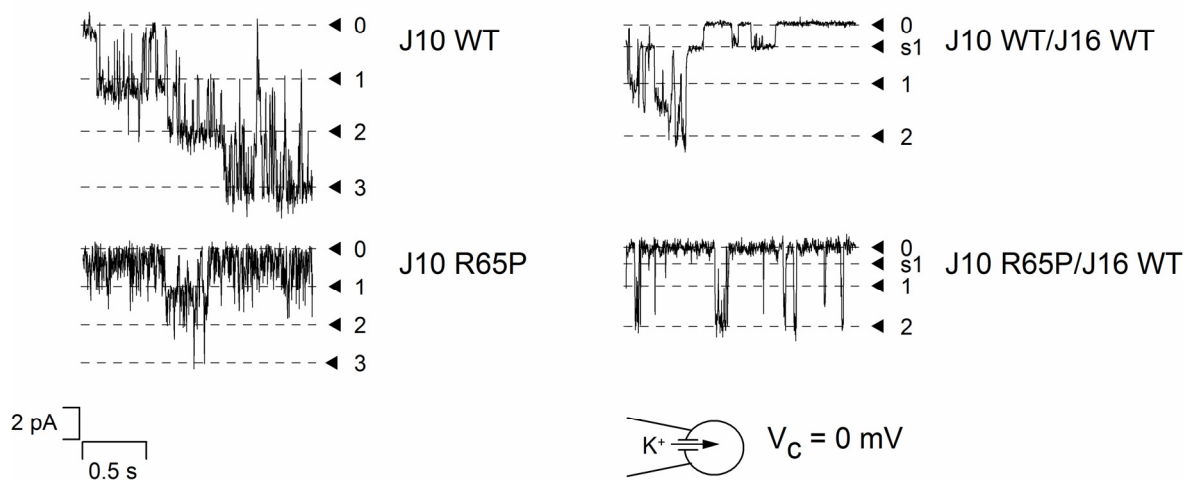


Abb. 4.13: Einzelkanalströme in transfizierten HEK293-Zellen: KCNJ10 (J10) WT und KCNJ10 (J10) R65P als Mono- und Coexpression mit KCNJ16 (J16) WT. Aufgezeichnet bei einer Klemmspannung $V_c = 0$ mV. (Datenerhebung in Zusammenarbeit mit E. Humberg, geb. Lieberer)

5 Diskussion

5.1 Dynamik der renalen Entwicklung bei C57BL6-Mäusen

5.1.1 Versuchstier Maus

Seit Einführung der transgenen und Gen-targeting-Technologien gewinnt die Spezies Maus als Versuchstier zunehmend an Bedeutung, da der Großteil dieser Technologien nur in Mäusen etabliert ist [92]. Allerdings waren es Ratten und andere größere Säugetiere, an denen die Forscher des 20. Jahrhunderts bahnbrechende Erkenntnisse über die Nierenphysiologie gewonnen haben. Daher gilt es, die für Ratten entwickelten Untersuchungstechniken zu adaptieren und Maus-spezifische Daten zu generieren, um eine aussagekräftige Arbeit mit Mäusen zu gewährleisten. Ein Schwerpunkt dieser Arbeit war daher das Studium der renalen Wasser- und Elektrolytausscheidung von heranwachsenden C57BL6 Wildtyp-Mäusen, ergänzt um die Analyse der Ionenkanalexpression im distalen Nephron dieser Tiere.

Im Vergleich zu Ratten stellen Mäuse besondere Herausforderungen an den Experimentator. Einerseits erschweren die Kleinheit der anatomischen Strukturen und die hohe Stressanfälligkeit den praktischen Umgang mit diesen Tieren. Andererseits zeigt sich eine große Variabilität zwischen den einzelnen Mäusestämmen hinsichtlich der renalen Morphologie, Funktion und Pathologien [92, 94, 95], was die Interpretier- und Vergleichbarkeit der jeweils erhobenen Daten schmälert.

5.1.2 Strukturelle und funktionelle Ontogenese der Niere

Der Organismus der Maus ist während seiner postnatalen Entwicklung zahlreichen Einflüssen ausgesetzt, wie Trennung vom maternalen Kreislauf, Nahrungsumstellung und rasches Wachstum (s. Kap. 4.1.1). Dies erfordert eine dynamische Anpassung des Volumen- und Elektrolythaushalts. Zudem erstreckt sich die strukturelle und funktionelle Nephrogenese bei Mäusen weit über die Geburt hinaus (s. Kap. 1.3.2). Daraus resultieren sowohl entwicklungsabhängige Veränderung der Morphologie und der Proteinexpression als auch massive Schwankungen der Wasser- und Elektrolytausscheidung mit charakteristischen Verläufen für die jeweiligen Ionen. Allerdings ist es nicht trivial, die Veränderungen auf den unterschiedlichen Ebenen, i.e. Proteinexpression und Ausscheidung, zu verknüpfen. Denn die Expression eines Proteins setzt nicht gleichsam dessen Funktion voraus [15], wie es weiter unten für Aquaporin 2 beschrieben wird. Außerdem analysierten wir mit dem Endharn die globale Nierenfunktion, also das funktionelle Nebeneinander unterschiedlich ausgereifter Strukturen (s. Kap. 4.1.2).

5.1.2.1 Renaler Wassermetabolismus

Die von uns untersuchte Kreatininkonzentration im Urin kann unter Einschränkungen (s. Kap. 5.1.2.3) als Parameter für die Harnkonzentrierungskapazität der Niere herangezogen werden. Sie korrelierte in unseren Messungen während der ersten 4 bis 6 Lebenswochen positiv mit dem Alter der Mäuse. Ursächlich für die verminderte Fähigkeit der Jungtiere, den Harn zu konzentrieren, sind die noch nicht ausgereifte Histoarchitektur der Niere (kurze Henle-Schleifen, die kaum ins Mark reichen), die geringgradig ausgeprägte Hyperosmolarität des medullären Interstitiums und insbesondere die mangelnde Empfindlichkeit der neonatalen Sammelrohrhauptzellen gegenüber dem antidiuretischen Hormon (ADH) [17, 26, 27, 96].

Anhand von HE- und IF-Färbungen konnten wir die strukturelle und funktionelle Reifung der dicken aufsteigenden Henlescheife (TAL) aufzeigen, im Einzelnen das Vordringen der Henle-Schleife ins innere Mark und die Expression des TAL-typischen Ionentransporters NKCC2. Diese Prozesse gelten als Voraussetzung für den Aufbau des kortikomedullären Osmolaritätsgradienten, der wiederum essentiell für die Harnkonzentrierung ist [17, 27, 96].

Ein erhöhtes Harnstoffangebot im Primärfiltrat infolge einer vermehrten alimentären Protein-zufuhr nach dem Abstillen [97, 98] sowie eine gesteigerte Expression von Harnstofftransportern [96, 99] sollen die Osmolarität des Interstitiums bei älteren Tieren zusätzlich steigern.

Die Unreife der endokrinen Osmoregulation, also der noch nicht ausreichend stattfindende ADH-abhängige Einbau von Aquaporin 2 (AQP2) in die luminale Plasmamembran der Hauptzellen des Sammelrohrs, gilt als *der* limitierende Faktor der Harnkonzentrierung. Aufgrund der Komplexität des Regulationsprozesses sind mehrere Aspekte zu beleuchten.

(1) Die ADH-Sekretion der Neurohypophyse ist zwar bei Neugeborenen vergleichsweise niedrig, soll aber die Konzentrierungsunfähigkeit der neonatalen Niere nicht bedingen [96, 100].

(2) Die renalen ADH-Rezeptoren (V2-Rezeptoren, G_s-Protein-gekoppeltes Signalling) werden bereits pränatal in ausreichendem Maße exprimiert [101], so dass die Ursache der verminderten ADH-Empfindlichkeit in der *intrazellulären* Signaltransduktion zu suchen ist.

(3) Der Second Messenger cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) stellt eine wahrscheinliche Ursache der verminderten ADH-Empfindlichkeit dar: Der intrazelluläre cAMP-Gehalt der neonatalen Hauptzellen lässt sich durch ADH-Stimulation nur unmerklich steigern [102, 103]. Die Unreife der Adenylatzyklase, die Inhibition der Adenylatcyclase durch Prostaglandin E₂ und die erhöhte Phosphodiesterase-Aktivität (PDE IV) in neonatalen Hauptzellen werden für den geringen cAMP-Gehalt verantwortlich gemacht [103, 104].

(4) Die eigentliche Zielstruktur des ADH-vermittelten Signallings, das Aquaporin 2 (AQP2), limitiert die altersabhängige Harnkonzentrierung angeblich nicht [96, 105]. Wie unsere Immunfluoreszenz-Färbungen zeigen (s. Kap. 4.1.2 und Abb. 4.5), wurde AQP2 bereits in der neonatalen Niere stark exprimiert. Die explizit luminale Färbung entwickelte sich aber erst im

postpartalen Verlauf, was der Zunahme der ADH-Wirksamkeit und der damit einhergehenden Verlagerung des AQP2 von den intrazellulären Vesikeln in die luminale Membran entspricht.

Bemerkenswerterweise zeigten die Kreatinin- und Elektrolytkonzentrationen im Endharn während der ersten beiden Lebenswochen nur geringfügige interindividuelle Schwankungen. Dies ist wohl auf die Eigenart unreifer Nieren zurückzuführen, verdünnten und gegenüber dem Primärfiltrat in Zusammensetzung und Volumen wenig veränderten Urin auszuschcheiden [106]. Damit ist der junge Organismus noch nicht in der Lage, adäquat auf die unterschiedlichen Stimuli, wie Wasserdeprivation oder -überladung, zu reagieren, so dass Neugeborene eine wesentlich größere Vulnerabilität gegenüber Volumenschwankungen zeigen.

5.1.2.2 Renale Elektrolytausscheidung

Die im Endharn von C57BL6-Mäusen gemessenen absoluten Konzentrationen an Natrium, Kalium, Calcium und Magnesium lagen zu Beginn des postnatalen Phase auf sehr niedrigem Niveau, was als eine unmittelbare Folge der verminderten Konzentrationsfähigkeit der neonatalen Niere anzusehen ist. Die relativen Ionenkonzentrationen (bezogen auf die Kreatininkonzentration) zeigten folgende Verläufe: Na^+ , K^+ und Ca^{2+} fielen von initial sehr hohen Werten rapide auf ein Minimum ab, um während der Abstillphase ab der 3. Lebenswoche erneut anzusteigen. Mg^{2+} wurde bereits perinatal in geringem Maße ausgeschieden und erreichte erst während des Abstillens höhere Konzentrationen im Urin.

Natrium. Der für Na^+ besonders ausgeprägte renale Salzverlust kurz nach der Geburt und der anschließende rasche Anstieg der Na^+ -Retention, wie bereits für Kaninchen und frühgeborene Säuglinge beschrieben [19, 24], lassen sich mit mindestens vier Faktoren begründen.

- (1) Unmittelbar nach der Geburt kommt es zur physiologischen Kontraktion des Extrazellulärums und damit zur vermehrten Ausscheidung von Wasser und Na^+ [107].
- (2) Durch die Ausdifferenzierung des proximalen Nephrons während der ersten Lebenswochen (Verlängerung des proximalen Tubulus und der Henle-Schleife, Expression funktionstüchtiger Ionentransporter, Ausreifung der parazellulären Transportwege und Zunahme der basolateralen Na^+/K^+ -ATPase-Aktivität) vervielfacht sich die Salzresorption im proximalen Tubulus und in der dicken aufsteigenden Henle-Schleife gleichzeitig und gleichförmig für Na^+ , K^+ , Ca^{2+} und Cl^- [21]. NKCC2 soll bereits in frühen Stadien der Nephrogenese exprimiert werden – zunächst nur in den künftigen Macula-densa-Zellen, später auch im Post-Macula-Segment und schließlich in der aufsteigenden Henle-Schleife. Während die primitive Henle-Schleife keinen Intermediärtubulus besitzt und die NKCC2-Expression bis proximal der U-förmigen Schleifenbiegung reicht, wird im reifen Nephron der Übergang von der dünnen aufsteigenden Henle-

Schleife in die dicke aufsteigende Henle-Schleife durch den abrupten Expressionsbeginn von NKCC2 markiert [15]. Eben diesen Reifungsprozess konnten wir an unseren Färbungen verfolgen (s. Abb. 4.3): die allmähliche Grenzziehung zwischen dem nicht angefärbten inneren Mark und dem NKCC2 exprimierenden äußeren Mark, was der Demarkation des Übergangs von der dünnen in die dicke aufsteigende Henle-Schleife entspricht.

(3) Im distalen Konvolut der adulten Niere wird ca. 10% des filtrierten Na^+ reabsorbiert, wobei der NaCl -Cotransporter NCC den luminalen Haupttransportweg darstellt. Die von mir gefärbten Gewebeschnitte zeigten ausgehend von einem spärlichen Signal zum Zeitpunkt der Geburt eine deutliche postnatale Expressionszunahme des NCC (s. Abb. 4.3). Diese Befunde bestätigen Schmitt et al. [15], die mittels In-situ-Hybridisierung die mRNA-Expression von NCC während der Nephrogenese untersucht haben. Auch die basolateralen Invaginationen des distalen Konvoluts, an denen durch „pump-leak-coupling“ (s. Kap. 1.4) die notwendige Energie für den sekundär-aktiven Transportprozess bereitgestellt wird, scheinen erst im Verlauf der ersten Lebenswochen auszureifen, was durch das sich allmählich verdichtende Fluoreszenzsignal der basolateral lokalisierten Kaliumkanäle KCNJ10 und KCNJ16 deutlich wurde (s. Abb. 4.6 und 4.7).

(4) Auch im Sammelrohr, Ort der Feinregulation des Na^+ -, K^+ - und H^+ -Haushalts, steigt die Resorptionskapazität für Na^+ während der ersten Lebenswochen deutlich an. Dies ist als Folge der Ausreifung des sekundär-aktiven Iontentransports (luminale Natriumkanäle ENaC, basolaterale Na^+/K^+ -ATPase, dichte Schlussleisten, lumen negatives transepitheliales Potential) und der zunehmenden Aldosteron-Empfindlichkeit zu werten [19, 24]. Aufgrund der noch undichten Schlussleisten in den ersten postpartalen Tagen soll die Na^+ -Resorptionskapazität der Sammelrohre bei Kaninchen erhöht sein [19]. Dieses Phänomen konnten wir durch die Endurinanalyse an C57BL6-Mäusen weder bestätigen noch widerlegen. Möglicherweise wird der genannte Reifungsschritt durch das Nebeneinander unterschiedlich reifer Nephrone oder durch die deutlich verminderte proximale Na^+ -Aufnahme überlagert.

Mit Beginn der Abstillphase ab der 3. Lebenswoche kommt es allmählich zur Umstellung der Ernährung von Muttermilch auf protein- und mineralienreiches Fertigfutter. Zeitgleich steigt die initial reduzierte Empfindlichkeit gegenüber Aldosteron und ADH, so dass ab diesem Zeitpunkt eine bedarfsgerechte Volumen- und Elektrolytausscheidung gewährleistet ist [19, 24]. Beide Prozesse zusammen resultieren offensichtlich während dieser Entwicklungsphase in einer erhöhten und interindividuell sehr unterschiedlichen Na^+ -Ausscheidung (s. Abb. 4.8).

Kalium. Der postnatale Abfall der relativen Kaliumausscheidung ($[\text{K}^+]/[\text{Krea}]$) lässt sich analog zu Na^+ auf die steigende Salzresorption im proximalen Tubulus und in der dicken aufstei-

genden Henle-Schleife (TAL) zurückführen. Die K^+ -Konzentration im Endurin fällt allerdings binnen der ersten Lebenswochen im Vergleich zu Na^+ und Ca^{2+} weniger stark ab, da vermutlich die distalen Resorptionsprozesse für den Netto- K^+ -Transport weniger bedeutsam sind. Allerdings darf bei Jungtieren die K^+ -Resorption des distalen Nephrons nicht unterschätzt werden. Der im Wachstum begriffene Organismus scheidet weniger K^+ aus, als er aufnimmt [23, 108, 109]. Wenn man berücksichtigt, dass in der neonatalen Niere aufgrund der unreifen TAL noch ca. 40% des glomerulär filtrierten K^+ den distalen Tubulus erreichen [21] (beim Adulten nur 5 - 15% [108, 110, 111]), muss K^+ offensichtlich auch distal der Macula densa in größeren Mengen aufgenommen werden. Zudem bildet sich die Aldosteron-abhängige K^+ -Sekretion im Sammelrohr erst in den ersten postpartalen Wochen aus, bei Ratten und Kaninchen gegen Ende des ersten Lebensmonats [20, 24]. Diese endokrine Veränderung erklärt zum Teil, warum die K^+ -Ausscheidung von vorübergehend niedrigen Werten ab der 3. Lebenswoche erneut ansteigt. Auch die Nahrungsumstellung trägt zum Anstieg der K^+ -Konzentration im Endurin bei.

Calcium. Die renale Ca^{2+} -Ausscheidung fällt postnatal nach einem vorübergehenden Anstieg ähnlich steil ab wie die Na^+ -Ausscheidung. Wenn wir – wie von Lelievre-Pegorier et al. [21] publiziert – davon ausgehen, dass sich die Ca^{2+} -Resorption im proximalen Tubulus und in der dicken aufsteigenden Henle-Schleife in demselben Maße wie die Na^+ - und K^+ -Resorption verändert, wird Ca^{2+} aufgrund des steilen Abfalls vermutlich bereits kurz nach der Geburt ebenfalls distal der Macula densa reabsorbiert. Eine essentielle Komponente des Ca^{2+} -Transports im distalen Tubulus ist der basolaterale Na^+/Ca^{2+} -Antiporter NCX (s. Abb. 5.1 A). Er soll während der Nephrogenese zunächst nur im Verbindungsstück, später auch im späten distalen Konvolut exprimiert werden [15]. Als elektrogener Transporter ist NCX auf das basolaterale „pump-leak-coupling“ angewiesen, das sich während der ersten Lebenstage ausbildet.

Neben der renalen Ausreifung sind die Kreislaufumstellung bei Geburt und die endokrine Regulation zu berücksichtigen. Dank eines aktiven diaplazentaren Transportmechanismus nimmt das fetale Serum- Ca^{2+} gegen Ende der intrauterinen Phase Werte an, die die mütterliche Konzentration deutlich übersteigen [112-115]. Parathormon (PTH), das neben Calcitriol maßgeblich den renalen Ca^{2+} -Metabolismus steuert und bereits pränatal seine Funktion ausübt [113, 116], ist perinatal durch den erhöhten Ca^{2+} -Spiegel supprimiert. Erst der rapide Abfall des Serum- Ca^{2+} infolge des Abnabelns stimuliert die PTH-Sekretion, die einen erneuten Anstieg des Serum- Ca^{2+} bedingt, indem PTH unter anderem die renale Ca^{2+} -Resorption direkt und indirekt über Calcitriol aktiviert. Der von uns gezeigte Rückgang der Ca^+ -Ausscheidung setzte erst einige Tage post partum ein, was einerseits durch die Unreife der renalen Strukturen, andererseits durch eine temporäre Hyposensitivität der PTH-Rezeptoren [116, 117] zu erklären war.

Magnesium. Im Gegensatz zu den bisher erörterten Ionen nahm die renale Mg^{2+} -Ausscheidung in der postpartalen Phase nicht ab. Laut Lelievre-Pegorier et al. [21], die wie wir (allerdings an Ratten) eine altersabhängige Zunahme der Mg^{2+} -Ausscheidung im Endharn gemessen haben, könnte dies durch eine postnatale Abnahme der Mg^{2+} -Permeabilität des proximalen Tubulus und einer bereits perinatal ausgereiften Mg^{2+} -Resorptionskapazität der dicken aufsteigenden Henle-Schleife erklärt werden.

5.1.2.3 Kreatininkonzentration – ein kritischer Parameter

Bei der bisherigen Interpretation der Ausscheidungsdaten ging ich stillschweigend von einer konstanten und altersunabhängigen Kreatininkonzentration im Plasma bzw. im Primärharn der Tiere aus. Außerdem setzte ich voraus, dass Kreatinin zu 100% glomerulär filtriert und tubulär kaum sezerniert/resorbiert wird. Allerdings gibt es Hinweise, dass Kreatinin in heranreifenden Nieren anders verstoffwechselt wird als im adulten Organismus.

In neugeborenen und in adulten Kaninchen stellte man nämlich Unterschiede zwischen der Kreatinin- und Inulin-Clearance fest, die sich nur durch die tubuläre Kreatininresorption in den neonatalen Tubuli rechtfertigen ließen [118, 119]. Vergleichbare Phänomene wurden auch bei Schweinen [120] und am Menschen [121] beobachtet.

Im adulten Tier gilt die Plasma-Kreatininkonzentration als Funktion der Muskelmasse. Im Blutplasma von Säuglingen, insbesondere von Frühchen, wurden hingegen Kreatininkonzentrationen gemessen, die bezogen auf deren Muskelmasse weit oberhalb der Norm lagen [119]. Dies kann nur zum Teil durch den präpartalen diaplazentaren Kreatinintransfer von der Mutter auf das Kind erklärt werden. Vermutlich trägt die tubuläre Kreatininresorption im Neonaten (s.o.) entscheidend zu den erhöhten Werten bei.

Angesichts der dargestellten Überlegungen und Fakten gilt es, mit dem Parameter *Kreatininkonzentration* in Urin und Plasma speziell bei sich entwickelnden Tieren kritisch umzugehen.

5.1.2.4 Schlussfolgerung

Während und nach der Geburt ist der Organismus der Maus mit vielfältigen endogenen und exogenen Veränderungen konfrontiert, die eine dynamische Anpassung des Volumen- und Elektrolythaushalts ermöglichen bzw. voraussetzen. Dies führt zu erheblichen Schwankungen der Elektrolyt- und Wassere exkretion, wobei die größten Veränderungen unmittelbar nach der Geburt und zwischen der 3. und 6. Lebenswoche stattfinden. Experimente zur renalen Ausscheidung, die während dieser Phasen durchgeführt werden, sollten daher einer besonders kritischen Analyse unterzogen werden.

5.2 Physiologische und pathologische Eigenschaften der Kaliumkanäle KCNJ10 und KCNJ16

5.2.1 Bedeutung des KCNJ10 und KCNJ16 für die renale Elektrolythomöostase

Mutationen des einwärtsgerichtenden Kaliumkanals KCNJ10 (Kir4.1) verursachen das seltene und komplexe Krankheitsbild EAST (*epilepsia, ataxia, sensorineural deafness and tubulopathy*) [85] oder SeSAME (*seizures, sensorineural deafness, mental retardation, and electrolyte imbalance*) [86], das als autosomal-rezessive, monogenetische Erbkrankheit neurologische und nephrologische Symptome vereint (s. Kap. 1.7). Die Tubulopathie ist durch Hypokaliämie, metabolische Alkalose, Hypomagnesiämie, Hypocalciurie und einen sekundären hyperreninämischen Hyperaldosteronismus charakterisiert und zeigt große Ähnlichkeiten mit dem Gitelman-Syndrom (s. Kap. 1.6.4) oder dem Nebenwirkungsprofil einer chronischen Diuretikatherapie mit Thiaziden [4]. Die beim EAST/SeSAME-Syndrom bzw. Gitelman-Syndrom betroffenen Genprodukte, also der Kaliumkanal KCNJ10 bzw. der NaCl-Cotransporter NCC, sind im distalen Konvolut (DCT) der Niere lokalisiert, wo sie direkt oder indirekt die Salzresorption gewährleisten (s. Abb. 5.1 A).

KCNJ10 wird in der Niere vermutlich mit einem weiteren einwärtsgerichtenden Kaliumkanal, dem KCNJ16 (Kir5.1), coexprimiert und säumt als Heterotetramer KCNJ10/KCNJ16 die basolateralen Invaginationen der mitochondrienreichen Epithelzellen des distalen Konvoluts, des Verbindungsstübels und des frühen Sammelrohrs [38, 48, 51]. Obwohl KCNJ10 und KCNJ16 nicht die einzigen basolateralen K^+ -Kanäle des distalen Tubulus darstellen, ist ihre Aktivität für die Funktion dieses Nephronabschnitts essentiell (s. Kap. 1.4 und Abb. 5.1 A). KCNJ10 und KCNJ16 stabilisieren das hyperpolarisierte Membranpotential der Epithelzelle, was eine notwendige Voraussetzung für den elektrogenen Ionentransport, z.B. den basolateralen Na^+ -gekoppelten Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Export und die basolaterale Cl^- -Sekretion, darstellt. Zudem unterstützt KCNJ10/KCNJ16 die Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase, indem der Kanal das von der Pumpe in die Zelle transportierte K^+ über die basolaterale Membran „recycled“ und damit das extrazelluläre Substratangebot für die Na^+/K^+ -ATPase garantiert – das sog. „pump-leak-coupling“ [31, 85, 86, 122].

Ein Funktionsverlust dieser Kanäle vermindert den transepithelialen Salztransport und induziert eine Kaskade kompensatorischer Prozesse, die in einer komplexen, lebensbedrohlichen Elektrolytstörung resultieren (s. Abb. 5.1 B), wie sie die EAST/SeSAME-Patienten (s. Kap. 1.7) und die KCNJ10-Knockout-Maus (s. Kap. 1.5.3 und 4.2) zeigen.

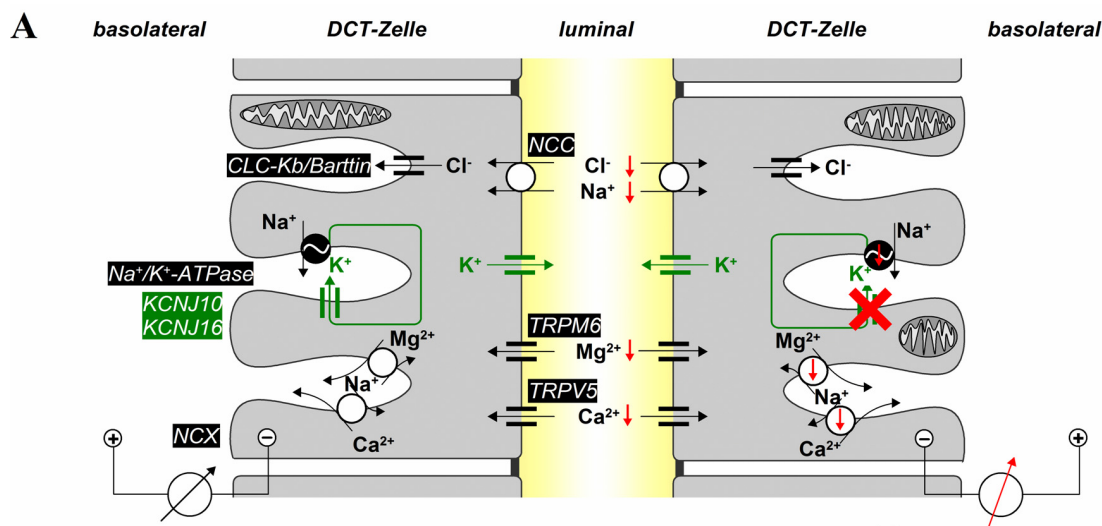


Abb. 5.1: Salztransport im DCT und Modell zur Entstehung der EAST/SeSAME-Tubulopathie.

A (links) Funktion des KCNJ10/KCNJ16 im distalen Konvolut (DCT)

Das distale Konvolut (DCT), in dem 5 - 15% des filtrierten Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} und Mg^{2+} resorbiert werden, zeichnet sich durch Mitochondrienreichtum und tiefe basolaterale Invaginationen aus.

Luminal werden Na^+ und Cl^- sekundär-aktiv über den thiazidsensitiven NaCl -Cotransporter NCC [32], Ca^{2+} und Mg^{2+} elektrogen über die Ca^{2+} - bzw. Mg^{2+} -spezifischen Kanäle TRPV5 und TRPM6 [4, 5, 33] aufgenommen. Basolateral verlässt Cl^- die Zelle über den Cl^- -Kanal CLC-Kb/Barttin [34]. Ca^{2+} und Mg^{2+} werden sekundär-aktiv im Austausch gegen Na^+ exportiert [4, 5]. Na^+ wird primär-aktiv mittels der Na^+/K^+ -ATPase aus der Zelle gepumpt. Das dabei aufgenommene K^+ wird über basolaterale K^+ -Kanäle, vorrangig über KCNJ10/KCNJ16, „recycled“, wodurch das extrazelluläre Substratangebot der Na^+/K^+ -ATPase sichergestellt wird („pump-leak-coupling“) [31, 85, 86]. Der KCNJ10/KCNJ16-vermittelte K^+ -Ausstrom erzeugt ein hyperpolarisiertes Membranpotential, das seinerseits für den elektrogenen Transport von Cl^- , Mg^{2+} und Ca^{2+} erforderlich ist.

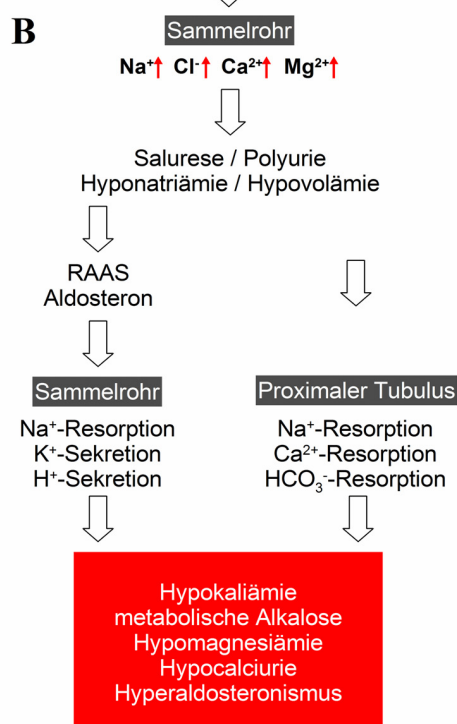
A (rechts) Auswirkungen eines defekten KCNJ10 auf die Funktion des DCT

Eine eingeschränkte KCNJ10/KCNJ16-Leitfähigkeit, z.B. infolge einer Mutation oder Deletion des KCNJ10, führt zum Zusammenbruch des basolateralen K^+ -Recyclings und zur Depolarisation des Membranpotentials. Daraufhin kommen die dargestellten Transportprozesse mehr oder minder zum Erliegen, so dass große Mengen an Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} und Mg^{2+} im Lumen des DCT verbleiben und auf dem Harnweg das Sammelrohr erreichen [86, 122].

B Modell zur Entstehung der Tubulopathie beim EAST/SeSAME-Syndrom und in der KCNJ10-KnockoutMaus

Die eingeschränkte Resorptionskapazität des DCT

B



bei EAST/SeSAME oder beim KCNJ10-Knockout erhöht das luminal Angebot an Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} und Mg^{2+} im Sammelrohr. Dies führt ähnlich wie die Wirkung von Schleifen- oder Thiaziddiuretika zunächst zu Salurese und Polyurie, später zu Hyponatriämie und Hypovolämie. In Folge wird das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) aktiviert, das seinerseits die Na^+ -Resorption, K^+ - und H^+ -Sekretion im Sammelrohr stimuliert. Parallel zum endokrinen Weg induziert die Hypovolämie/Hyponatriämie eine Steigerung der Na^+ -Resorption im proximalen Tubulus (PT), wobei die luminalen Transport hauptsächlich über den Na^+/H^+ -Antiporter NHE3 erfolgen soll. Dies führt erstens zur vermehrten H^+ -Sekretion bzw. HCO_3^- -Resorption im PT, zweitens zum Anstieg des elektrochemischen Gradienten, der die parazelluläre Ca^{2+} -Resorption im PT forciert [4, 85, 86, 122].

Neben der reinen Transportfunktion könnten KCNJ10 bzw. KCNJ10/KCNJ16 auch Einfluss auf die Differenzierung und Proliferation des renalen Epithels nehmen, so wie es für KCNJ10 bereits im Rahmen der Oligodendrozytenreifung beschrieben ist [61, 62, 123, 124] und wie es für einen weiteren einwärtsrichtenden Kaliumkanal, den KCNJ8 (Kir6.1), an Nierenzellen *in vitro* gezeigt wurde [125]. Das elektronenmikroskopisch untersuchte Nierenbiopsat eines EAST/SeSAME-Patienten gibt Anhalt dafür, dass die Kanalmutation zu morphologischen Veränderungen führt, genauer zur Atrophie des distalen Konvoluts (DCT), zur Reduktion der Mitochondrienzahl sowie zum Verlust der basolateralen Invaginationen in den DCT-Zellen [87]. Auch der von uns aufgedeckte morphologische Unterschied zwischen Knockout- und Wildtyp-Niere (s. Kap. 4.2.2) legt den Einfluss des KCNJ10 auf Wachstum und Differenzierung nahe.

In dieser Arbeit untersuchte ich die entwicklungsabhängige Expression von KCNJ10 und KCNJ16 in Nieren heranwachsender C57BL6-Mäuse. Um die funktionellen Auswirkungen eines defekten KCNJ10-Gens aufzuklären, studierte ich zum einen die postnatale Entwicklung der KCNJ10-Knockout-Maus mit Fokus auf der renalen Histomorphologie und Ausscheidung. Zum anderen untersuchten wir die funktionellen Konsequenzen der EAST/SeSAME-Mutation KCNJ10 R65P auf elektrophysiologischer Ebene, wobei auch hier die Coexpression mit KCNJ16 berücksichtigt wurde.

5.2.2 Entwicklungsabhängige Expression von KCNJ10 und KCNJ16 in der Niere von WT-Mäusen

In den Nieren heranwachsender C57BL6-Wildtyp-Mäuse fanden wir bereits unmittelbar nach der Geburt eine KCNJ10- und KCNJ16-spezifische Immunreaktivität (s. Abb. 4.6 und 4.7). Mit zunehmendem Alter der Tiere nahm für beide Kanäle in ähnlicher Weise die Expressionsdichte zu. Dies ist mitunter auf das bereits für NCC erwähnte Phänomen zurückzuführen, dass das distale Konvolut als der Hauptexpressionsort von KCNJ10, KCNJ16 und NCC bei Geburt unterentwickelt ist und erst im Verlauf der ersten Lebenswochen an Länge gewinnt.

Auf Einzelzelebene war eine sukzessive Verschiebung der Kanalexpression in die basolaterale Domäne nachzuweisen. Diese Veränderung steht im Einklang mit der postnatalen Morphogenese des Nierenepithels, d.h. mit der Entwicklung der Zellpolarität, mit der Zunahme der Zelloberfläche und der Ausformung der basolateralen Einfaltungen im DCT [126-128].

5.2.3 Renaler Phänotyp der KCNJ10-Knockout-Maus

Die KCNJ10-Knockout-Maus – ein geeignetes Modell, um die Auswirkungen des defekten Kaliumkanals KCNJ10 in vivo zu untersuchen – ist bezüglich ihres ZNS-Phänotyps vielfach beschrieben: Ataxie, Epilepsie, Paralyse, substantielle Defekte in Gehirn und Rückenmark, sensorineurale Taubheit, Sehstörungen (s. Kap. 1.5.3) [61-67]. Daher konzentrierten sich unsere Untersuchungen auf den renalen Aspekt des KCNJ10-Knockouts.

5.2.3.1 Postnatale Entwicklung und Nephrogenese

Die KCNJ10-Knockout-Mäuse verstarben bereits binnen der ersten Lebenswoche, was einerseits die fundamentale Bedeutung dieses K⁺-Kanals unterstreicht, andererseits eine umfassende Analyse der Pathologien erschwerte. Inwiefern die Elektrolytentgleisung den Tod der Tiere bedingt, lässt sich durch den Vergleich mit dem ZNS-spezifischen konditionalen Knockout abschätzen. Tiere mit dem isolierten ZNS-Knockout überleben 3 - 4 Wochen [70], also deutlich länger als der komplette Knockout. Daher scheint die renale Dysfunktion die postnatale Entwicklung sehr negativ zu beeinflussen.

Für die Nephrogenese der Maus scheint KCNJ10 von essentieller Bedeutung zu sein, da die histologische Struktur der Knockout-Niere verglichen mit der Wildtyp-Niere massiv verändert bzw. unterentwickelt war (s. Abb. 4.10). Der gesamte Nierenquerschnitt und speziell die zentralen Anteile Nierenmark und Papille sind beim Knockout verkümmert. Das Nierenbecken ist dilatiert. Vergleichbare morphologische Veränderungen sind für ROMK-Knockout-Mäuse beschrieben, wobei Lorenz et al. [129] eine mutmaßliche Hydronephrose dafür verantwortlich machen. Aus unserer Sicht ist die Nierenanomalie der KCNJ10-Knockout-Maus als Reifungsstörung zu werten, die zum einen direkt durch die fehlende wachstumsfördernde Wirkung des KCNJ10, zum anderen indirekt durch den reduzierten Allgemeinzustand bedingt ist.

Zweifelsohne wird die Funktion der strukturell veränderten Knockout-Niere auch unabhängig von den defekten tubulären Transportprozessen im distalen Konvolut und Sammelrohr pathologisch verändert sein, so dass bei der Interpretation der Ausscheidungsdaten nicht nur die unmittelbare Funktion des KCNJ10 und KCNJ16 im distalen Konvolut und Sammelrohr (s. Abb. 5.1 A) sondern auch die anormale Nierenmorphologie berücksichtigt werden muss. Außerdem wird die renale Ausscheidung zusätzlich durch den deutlich reduzierten Allgemeinzustand und der damit einhergehenden Trinkschwäche beeinträchtigt.

5.2.3.2 Renale Ausscheidungsfunktion

Die renale Exkretion der Knockout-Tiere war in der ersten Lebenswoche durch folgende Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe, d.h. Wildtypen und heterozygote Tiere, gekennzeichnet: eine verminderte absolute Kreatininkonzentration im Urin, eine reduzierte absolute und relative Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Konzentration im Urin, eine erhöhte relative Na^{+} - und K^{+} -Konzentration im Urin (s. Abb. 5.2). Diese Daten bestätigen weitgehend das etablierte pathophysiologische Modell zur Entstehung der EAST/SeSAME-Tubulopathie (s. Abb. 5.1 B) und die an Patienten erhobenen Befunde [85, 86].

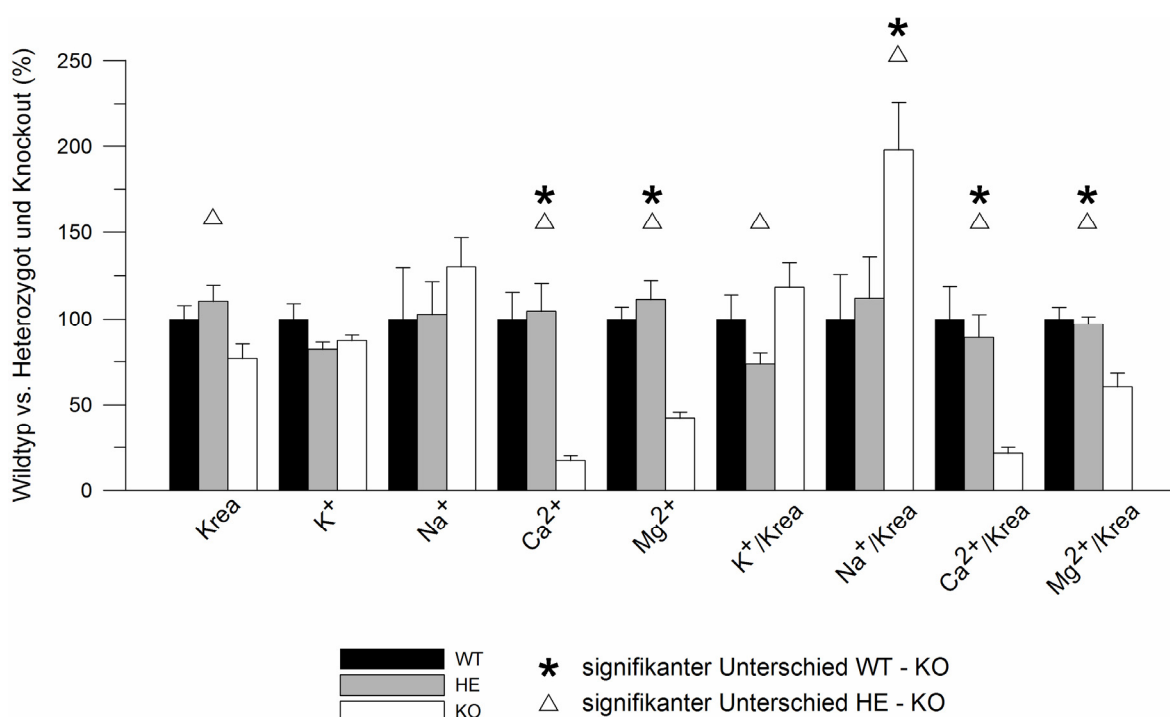


Abb. 5.2: Ausscheidungsfunktion der KCNJ10-Knockout-Maus (KO) zwischen dem 3. und 6. Lebens- tag im Vergleich zur Kontrolle Wildtyp (WT) und heterozygot-KCNJ10-knockout (HE). Zusammenfassung der Daten aus Abb. 4.11. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der Kreatinin- und Ionenausscheidung bezogen auf den Wildtyp (100%) gemittelt über den Zeitraum pp3 bis pp6. Die unmittelbare postpartale Phase (pp1 und pp2) wurde nicht berücksichtigt, da die Ausscheidungsfunktion während dieser Zeit einer massiven Dynamik unterliegt, die die eigentliche Fragestellung überlagern würde. Bei der statistischen Auswertung wurden einzelne Messwerte eliminiert, die entsprechend dem Box-Whisker-Plot außerhalb des unteren/oberen Whiskers (3-facher Interquartilsabstand) lagen und demnach als „extreme Ausreisser“ zu bewerten sind.

Aldosteron und Hyperkaliurie bei neonatalen KCNJ10-Knockout-Mäusen

Kritisch hinterfragt werden muss die Beteiligung des Mineralocorticoids Aldosteron an der Entstehung der EAST/SeSAME-Tubulopathie in neonatalen Knockout-Mäusen.

Der sekundäre Hyperaldosteronismus, ausgelöst durch die initiale Natriuresis und Hypovolämie, trägt nach dem etablierten Modell (s. Abb. 5.1 B) entscheidend zur Hyperkaliurie und metabolischen Alkalose bei – eine Überlegung, die für den reifen Organismus mit Sicherheit gültig ist. In Neonaten treffen wir dagegen auf einige physiologische Besonderheiten. So wur-

de für das distale Nephron von Jungtieren aus unterschiedlichen Spezies (z.B. Ratte, Kaninchen, Mensch) eine relative Unempfindlichkeit gegenüber Aldosteron nachgewiesen [19, 20, 23, 24, 130, 131]. Gleichzeitig sind die Mineralocorticoidspiegel im Serum von Neugeborenen überproportional hoch [25, 41].

Aufgrund der vorübergehenden Aldosteron-Unempfindlichkeit der neonatalen Sammelrohrhauptzellen gilt es, Faktoren zu beleuchten, die neben dem endokrinen Mechanismus *Hyperaldosteronismus* die Entstehung der Hyperkaliurie bei EAST/SeSAME-Patienten bzw. bei der KCNJ10-Knockout-Maus erklären.

(1) Der luminale Harnfluss im Sammelrohr, wie er z.B. bei Polyurie oder Diuretikatherapie verstärkt auftritt, gilt als wesentlicher Stimulus für die K^+ -Exkretion [130, 132, 133]. Die Knockout-Maus scheidet aufgrund der Salurese vermehrt Urin aus, was an der verminderten Kreatininkonzentration des Urins zu erkennen ist. Infolge des gesteigerten Harnflusses wird mehr K^+ über die Hauptzellen des Sammelrohrs sezerniert.

(2) Die K^+ -Homöostase und das Säure-Basen-Gleichgewicht stehen in einem engen Wechselspiel. Bei EAST/SeSAME-Patienten und KCNJ10-Knockout-Mäusen führen die HCO_3^- -Resorption im proximalen Tubulus und/oder die aldosteronabhängige H^+ -Sekretion im Sammelrohr (s. Abb. 5.1 B) zur metabolischen Alkalose, welche die Hyperkaliurie vermutlich verschärft. Alkalotische Stoffwechselzustände bewirken nämlich in allen Körperzellen eine intrazelluläre Anreicherung von K^+ , die speziell in den Sammelrohrhauptzellen die luminale K^+ -Sekretion antreibt.

(3) Die cytoplasmatische K^+ -Konzentration der Hauptzelle könnte im EAST/SeSAME-Patienten und in der Knockout-Maus auch aufgrund der defizitären basolateralen KCNJ10-Aktivität erhöht sein und die K^+ -Sekretion verstärken. Die Bedeutung dieses K^+ -Kanals ist allerdings für die Hauptzellen bisher nicht eingehend untersucht. Vermutlich spielt KCNJ10 für die basolaterale K^+ -Leitfähigkeit des Sammelrohrs neben KCNQ1/KCNE3, KCNN4 [134], KCNJ13 [135] und anderen K^+ -Kanälen nur eine untergeordnete Rolle.

(4) Eine physiologische Besonderheit des neonatalen distalen Nephrons liegt in der entgegengesetzten K^+ -Transportrichtung, d.h. Resorption statt Sekretion (s. Kap. 5.1.2.2). Über die K^+ -Resorption im distalen Nephron ist bis auf eine Zellpopulation im Sammelrohr – Schaltzellen Typ A, die bei Azidose/Hypokaliämie primär-aktiv über die luminale H^+ -ATPase und H^+/K^+ -ATPase H^+ sezernieren und K^+ resorbieren [9, 108] – wenig bekannt. Daher darf spekuliert werden, dass KCNJ10-positive Zellen im neonatalen Nephron an der K^+ -Resorption beteiligt sind. So könnte der defekte KCNJ10 im unreifen distalen Konvolut und Sammelrohr nicht nur die gestörte Na^+ -, Cl^- -, Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Resorption, sondern auch die Hyperkaliurie unmittelbar verursachen.

(5) Mangels Konsekutivfärbungen von KCNJ10 und NKCC2 an heranreifenden Nieren ist derzeit nicht auszuschließen, dass KCNJ10 in Jungtieren auch proximal der Macula densa exprimiert wird und dass auch dort der mutierte KCNJ10 die Salzresorption beeinträchtigt und die Hyperkaliurie verstärkt.

Magnesium – Unterschied zwischen EAST/SeSAME und dem KCNJ10-Knockout

Während die Knockout-Maus für K^+ und Ca^{2+} die Symptome der EAST/SeSAME-Patienten bzw. das Modell zur Entstehung der Tubulopathie bestätigt, beobachteten wir im Tierversuch statt des vermuteten renalen Mg^{2+} -Verlusts eine Hypomagnesiurie. Dieses Phänomen ist wahrscheinlich darin begründet, dass sich der proximale Tubulus (PT) in Abhängigkeit vom Alter unterschiedlich an der Mg^{2+} -Resorption beteiligt. Während der adulte PT weniger als 10% des filtrierte Mg^{2+} aufnimmt, resorbieren Neonaten über ein Drittel des filtrierte Mg^{2+} in diesem Nephronsegment [21]. Die kompensatorisch gesteigerte Na^+ -Resorption im PT (s. Abb. 5.1 B) aktiviert bei den neugeborenen Knockouts daher nicht nur die Aufnahme von Ca^{2+} im PT, sondern in ähnlichem Umfang auch die Aufnahme von Mg^{2+} . Auf diese Weise kann möglicherweise die unreife Niere den Verlust von Ca^{2+} und Mg^{2+} gleichermaßen kompensieren, was der reifen Niere wegen der eingeschränkten Mg^{2+} -Resorptionskapazität des PT nicht gelingt [4].

Bedeutung eines defekten KCNJ10 für Maus und Mensch

Bemerkenswerterweise entwickelten sich die Gewichts- und Ausscheidungsunterschiede zwischen gesunden und kranken Tieren erst post partum, was die Bedeutung des diaplazentaren Stoffaustauschs verdeutlicht. Intrauterin wird zwar Urin produziert; die renale Ausscheidung ist aber für die Homöostase des Fetus von marginaler Bedeutung, da das fetale „*milieu intérieur*“ durch den fetoplazentaren Austausch reguliert wird. Auf ZNS-Ebene kann allerdings nicht von einer Kompensation durch die Mutter ausgegangen werden, da es sich hier einerseits um KCNJ10-abhängige Reifungsprozesse, andererseits um Abläufe im „abgeschlossenen“ Kompartiment Gehirn handelt. Die neurologischen Defizite sollten daher, wenn man sie denn bei den neonatalen Mäusen untersuchen könnte, bereits bei Geburt vorhanden sein.

Das Maus-Modell, so wie wir es beurteilen und wie es bereits beschrieben ist [61-67, 70], stimmt in weiten Teilen mit den für EAST/SeSAME-Patienten charakteristischen Symptomen überein [85, 86]. Allerdings scheint der Gendefekt den Organismus der Maus wesentlich stärker zu beeinträchtigen als den des Menschen. Im Gegensatz zu den Patienten sind die Knockout-Tiere nicht in der Lage, den gestörten Elektrolyt- und Volumenhaushalt zu kompensieren, sondern versterben frühzeitig (s. Kap. 4.2.1 und [85]). Außerdem wirkt sich der defekte KCNJ10 deutlich stärker auf die renale und cerebrale Morphologie der Maus aus, als es bei den erkrankten Menschen der Fall ist.

Eine mögliche Ursache dieser Abweichung liegt in der Art der genetischen Störung: kompletter Genverlust im Maus-Modell versus homozygote oder compound-heterozygote Genmutationen bei den EAST/SeSAME-Patienten. Zu bemerken ist hier allerdings, dass die 14 bisher in Patienten nachgewiesenen Mutationen zumindest in vitro eine sehr unterschiedliche Restfunktion besitzen, was in einigen Fällen einem kompletten Genverlust gleichkommt [87-91, 136]. Trotz der unterschiedlichen Gendefekte präsentieren die betroffenen Kinder ein sehr ähnliches klinisches Bild, so dass man von noch nicht ergründeten Kompensationsmechanismen ausgehen muss.

Aufgrund der vielfach erwähnten Speziesunterschiede ist es auch möglich, dass KCNJ10 für die Maus prinzipiell eine größere Relevanz hat als für den Menschen.

Nicht zu vernachlässigen ist ferner der reduzierte Reifezustand der neonatalen Maus gegenüber einem humanen Neugeborenen. So ist die Mauseniere eventuell wegen ihrer Unreife nicht in der Lage, die pathologischen Elektrolytverschiebungen zu kompensieren. So haben Versuche an gesunden Ratten gezeigt, dass Neonaten mit applizierten hyper- oder hypotonen Lösungen wesentlich schlechter umgehen konnten und größtenteils daran verstarben, während etwas ältere Tiere diesen Eingriff gut tolerierten [106].

Trotz aller Unterschiede zwischen Patient und Tiermodell stellt die Knockout-Maus ein geeignetes Instrument dar, um den Gendefekt systematisch in vivo zu studieren. Erschwerend ist freilich die kurze Lebenserwartung der Tiere, also die Beschränkung des Beobachtungszeitraums auf die erste Lebenswoche, die ohnehin durch eine äußerst dynamische Nierenentwicklung gekennzeichnet ist. Leider können wir anhand dieses Tiermodells keine Aussage darüber treffen, in welchem Ausmaß die Tubulopathie den Mäuseorganismus beeinträchtigt, da die zentralnervösen Symptome ebenso limitierend wirken und unter Umständen auch Einfluss auf die Nierenfunktion nehmen, z.B. durch ein verändertes Trinkverhalten. Genauere Erkenntnisse über die renalen Auswirkungen des KCNJ10-Knockouts werden künftige Studien an Mäusen erbringen, bei denen mit Hilfe des Cre/loxP-Rekombinationssystems [137] eine nierenspezifische Gendeletion etabliert wurde.

5.3 Elektrophysiologische und biochemische Aspekte einiger EAST/SeSAME-Mutanten, insbesondere KCNJ10 R65P

Die autosomal-rezessive, monogenetische Erbkrankheit EAST/SeSAME wird durch ein Funktionsdefizit des Gens KCNJ10 bzw. dessen Genprodukts, des einwärtsgerichteten Kaliumkanals Kir4.1, verursacht. Bei den bisher diagnostizierten Patienten wurden insgesamt 14 unterschiedliche Mutationen identifiziert (s. Abb. 1.5 C), die entsprechend ihrer Art und Lokalisation auf unterschiedliche Weise die Kanalfunktion torpedieren [85, 86, 88, 90, 91, 136]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Missense-Mutation c.194G>C (entspricht p.R65P, kurz R65P) elektrophysiologisch untersucht.

5.3.1 Elektrophysiologische Eigenschaften der Mutante KCNJ10 R65P sowie der Einfluss der Heteromerbildung mit KCNJ16 WT

Die Whole-Cell-Experimente an CHO-Zellen zeigten bei Monotransfektion für KCNJ10 R65P eine mässig eingeschränkte Kanalaktivität. Dieses beobachtete Funktionsdefizit wurde durch die Einzelkanalmessungen an HEK293-Zellen in der Cell-attached-Konfiguration konsolidiert: R65P zeichnete sich gegenüber KCNJ10 WT durch eine deutlich geringere Offenwahrscheinlichkeit, durch ein auffälliges „Flickern“ und damit durch eine reduzierte Leitfähigkeit aus. Ein weiteres Merkmal der Mutante in Abgrenzung zum WT-Kanal ist die veränderte pH-Sensitivität, die im Kap. 5.3.3 abgehandelt wird.

Im nativen Gewebe, insbesondere im Nierenepithel, vermutet man eine Heterotetramerbildung von KCNJ10 (Kir4.1) und KCNJ16 (Kir5.1) [38, 40, 48, 138], so dass aus klinischer und therapeutischer Sicht die Analyse des Heteromers von großem Interesse ist.

KCNJ16 soll in vivo im Gegensatz zu KCNJ10 nur als Heteromer, nicht aber als Homomer einen funktionstüchtigen Kanal bilden [39, 48, 51, 52, 138], was unsere Arbeitsgruppe mit folgenden Analysen belegen konnte: Weder in Whole-cell-Experimenten (s. Kap. 4.3) noch in Einzelkanalmessungen (Daten hier nicht dargestellt) unterschieden sich die Ströme der KCNJ16-monotransfizierten Zellen von den scheintransfizierten Kontrollzellen. Vermutlich fehlen der Kanaluntereinheit KCNJ16 jene Aminosäuresequenzen, welche das posttranslationale Targeting und die permanente Integration des Kanalproteins in die Plasmamembran ermöglichen. Erst durch Polymerisierung mit anderen Proteineinheiten, z.B. KCNJ10 oder KCNJ15, sollen funktionelle Kanäle entstehen, die sich ihrerseits in einigen elektrophysiologischen Eigenschaften von den dazugehörigen Homomeren abheben [39, 48, 51, 52, 59, 138].

In unseren Whole-cell-Analysen zeigte das Heteromer KCNJ10/KCNJ16 ein dem Homomer KCNJ10 ähnliches Verhalten, während die Einzelkanaluntersuchungen für das Heteromer folgende Unterschiede aufzeigten: variable Einzelkanalamplitude, mindestens ein Sublevel, statt kontinuierlichem Stromfluss vereinzelte „Bursts“ und damit eine stark reduzierte Offenwahrscheinlichkeit.

Außerdem sind für das Homomer KCNJ10 und das Heteromer KCNJ10/KCNJ16 klare Unterschiede in der Sensitivität gegenüber einer intrazellulären pH-Verschiebung beschrieben [51, 52, 55, 56]: Der pH-sensitive Bereich des KCNJ10/KCNJ16 liegt mit einer halbmaximalen Aktivität (IC_{50}) von pH 7,45 innerhalb der physiologischen Grenzen, während die IC_{50} von KCNJ10 bei pH 6,0 zu verzeichnen ist. So erscheint es nahe liegend, dass der heteromere Kanal in vivo maßgeblich an der renalen pH-Homöostase beteiligt ist [51, 52, 55, 56].

Den Einfluss der Heteromerisierung auf die EAST/SeSAME-Mutation KCNJ10 R65P demonstriert das elektrophysiologische Verhalten des Heteromers KCNJ10 R65P/ KCNJ16 WT: Im Whole-cell-Modus zeigt sich im Vergleich zum Homomer KCNJ10 R65P eine massive Einschränkung der Membranhypervolarisation und des Bariumeffekts (KCNJ10 WT > KCNJ10 R65P >> KCNJ10 R65P/KCNJ16 WT; s. Abb. 4.12). Auf Einzelkanalebene liegen folgende Unterschiede zwischen dem mutierten Heteromer und dem mutierten Homomer vor: KCNJ10 R65P/KCNJ16 WT öffnete im Vergleich zu KCNJ10 R65P noch seltener und zeigte dadurch eine stark reduzierte Leitfähigkeit (s. Abb. 4.13).

Unseren Analysen zufolge wurden die Funktionsdefizite des KCNJ10 R65P durch die Heteromerbildung mit KCNJ16 nicht abgemildert. Dieser Befund wurde durch eine differenzierte Abhandlung über die molekularen Mechanismen der EAST/SeSAME-Mutationen in COS-Zellen [91] bestätigt. Gemäß dieser Forschungsarbeit kann bemerkenswerterweise durch die Coexpression von KCNJ10 WT und KCNJ10 R65P die ursprüngliche Funktion der Kanäle nahezu vollständig wiederhergestellt werden, was die Symptomfreiheit der heterozygoten Familienmitglieder der EAST/SeSAME-Patienten rechtfertigt.

5.3.2 EAST/SeSAME-Mutationen der ersten Transmembrandomäne – Lokalisation, Funktion und Protein Alignment

Betrachtet man die 14 bereits gefundenen EAST/SeSAME-Mutationen auf Proteinebene, so kommen fünf davon in der ersten Transmembrandomäne (TM1) zu liegen: R65P, R65C, F75L, F75C und G77R (s. Abb. 1.5 C und 5.3 A). TM1 ist nicht nur unter den Säugetieren hoch konserviert. Insbesondere sind die drei Aminosäuren R65, F75 und G77 über die zoologischen Klassengrenzen hinaus homolog (s. Abb. 5.3 B), was deren Bedeutsamkeit unterstreicht und die schwerwiegenden funktionellen Auswirkungen der fünf Mutationen erklärt.

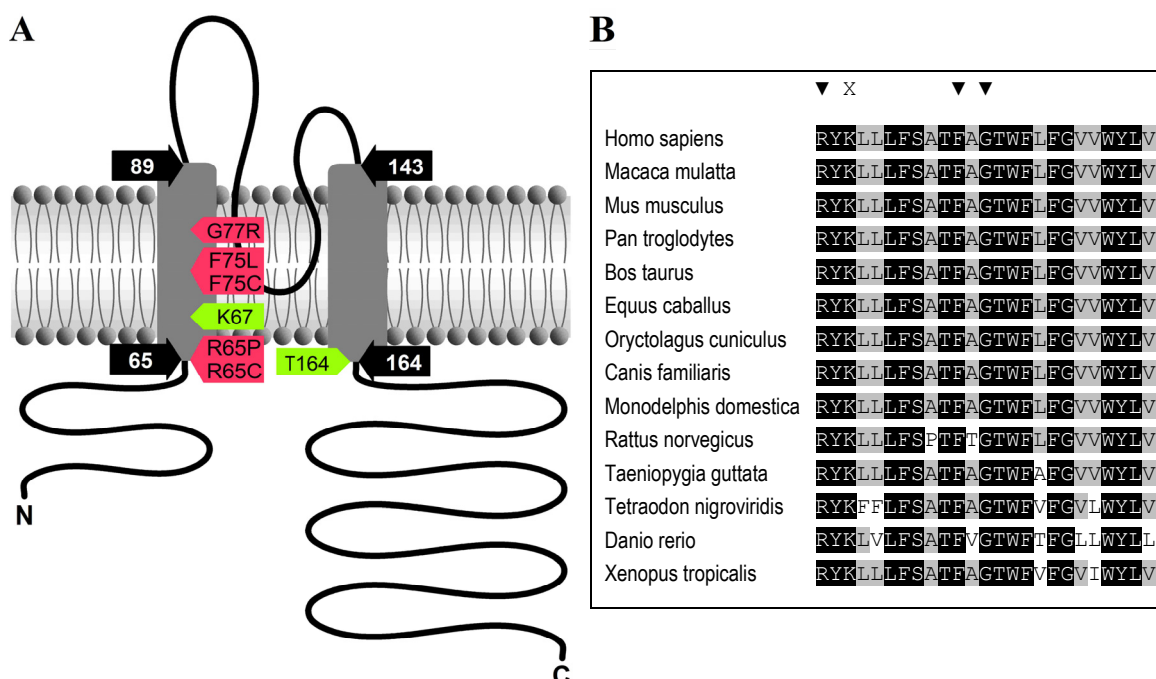


Abb. 5.3 Biochemische und molekulargenetische Betrachtung der EAST/SeSAME-Mutationen innerhalb der ersten Transmembrandomäne des KCNJ10.

A Membrantopologie des humanen KCNJ10 (entsprechend SwissProt P78508)

Als Mitglied der Familie der einwärtsgerichteten Kaliumkanäle besitzt KCNJ10 den charakteristischen Aufbau 2TM-1P, d.h. dass jede Kanaluntereinheit von zwei Transmembrandomänen (TM1 und TM2) und einer porenbildenden Schleife (P) gebildet wird [46]. Vier dieser Kanaluntereinheiten (je 379 Aminosäuren lang) polymerisieren in vivo zu funktionellen Kanälen. KCNJ10 bildet auch Heterotetramere mit KCNJ16, welcher eine ähnliche Topologie aufweist.

Pinke Pfeile markieren die fünf in der TM1 lokalisierten EAST/SeSAME-Mutationen, grüne Pfeile markieren die für das pH-Gating entscheidenden Aminosäuren K67 und T164 [52, 55, 56, 139, 140].

B Protein-Alignment der ersten Transmembranregion (TM1) des KCNJ10

Dargestellt ist die Aminosäuresequenz der ersten Transmembrandomäne (TM1) des KCNJ10 von 14 Spezies aus unterschiedlichen zoologischen Klassen. Die Pfeilspitzen kennzeichnen die Positionen der EAST/SeSAME-Mutationen R65P, R65C, F75L, F75C und G77R. X markiert jenen Lysinrest (beim Menschen K67), der eine Schlüsselrolle für die pH-Sensitivität des Kaliumkanals spielt.

(Proteinsequenzen entsprechend NCBI GeneBank: Homo sapiens NP_002232.2, Macaca mulatta XP_001115293.2, Mus musculus NP_001034573.1, Pan troglodytes XP_513920.2, Bos Taurus NP_001075070.1, Equus caballus XP_001491261.2, Oryctolagus cuniculus XP_002715299.1, Canis familiaris XP_545752.2, Monodelphis domestica XP_001369750.1, Rattus norvegicus NP_113790.1, Taeniopygia guttata XP_002191660.1, Tetraodon nigroviridis CAF95232.1, Danio rerio XP_002663107.1, Xenopus tropicalis NP_001072312.1).

R65 liegt am Übergang von der N-terminalen zytosolischen Domäne zur TM1. Durch die Nähe zu K67 soll die Mutante R65P und wahrscheinlich auch R65C das pH-abhängige Kanal-Gating beeinflussen (s. Kap. 5.3.4).

F75 und G77 sind inmitten der TM1 lokalisiert. Durch die Mutation F75C wird ein hydrophober durch einen hydrophilen Aminosäurerest ersetzt. In G77R kommt es zum Austausch der kleinen neutralen Aminosäure Glycin gegen das basische Arginin. Beides führt im hydrophoben Inneren des Membran-Bilayers vermutlich zu signifikanten Veränderungen der Porenstruktur und des Kanal-Gatings [91, 136].

5.3.3 Einige EAST/SeSAME-Mutationen verändern die pH-Sensitivität

Ein für den Kaliumkanal KCNJ10 typisches Merkmal ist die pH-Abhängigkeit der Kanalaktivität (s. Kap. 1.5.1). Auch unsere Arbeitsgruppe untersuchte im Rahmen der Charakterisierung der EAST/SeSAME-Mutanten die Schaltkinetik der Einzelkanäle in Abhängigkeit von der intrazellulären Protonenkonzentration und kam zu einem bemerkenswerten Ergebnis: Die Missense-Mutation R65P, also der Austausch der basischen Aminosäure Arginin gegen die unpolare Aminosäure Prolin, verschiebt den pH-sensitiven Bereich des Kaliumkanals. Während KCNJ10 WT in HEK293-Zellen seine halbmaximale Aktivität (IC_{50}) bei pH 6,3 erreicht, liegt die IC_{50} für R65P deutlich weiter im Alkalischen (s. Abb. 5.4).

Somit ist der verminderte Stromfluss über KCNJ10 R65P zu großen Teilen durch die Verschiebung des pH-sensitiven Bereichs zu erklären, also durch ein funktionelles Defizit unter den gegebenen Messbedingungen (pH 7,4).

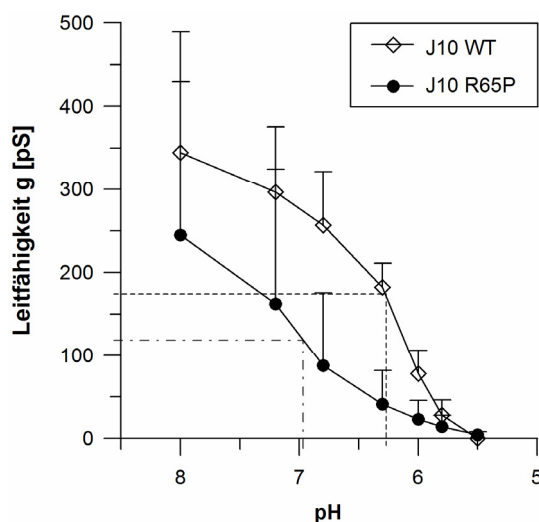


Abb. 5.4 pH-Sensitivität der homomeren Einzelkanäle KCNJ10 WT und KCNJ10 R65P, exprimiert in HEK293-Zellen. Positive Korrelation zwischen der intrazellulären Protonenkonzentration und der Leitfähigkeit. Durch die Mutation R65P wird der pH-sensitive Bereich von KCNJ10 zum Alkalischen hin verschoben. IC_{50} von KCNJ10 WT bei ca. pH 6,3 (Strichlinie), IC_{50} von KCNJ10 R65P bei ca. pH 7,0 (Strichpunktlinie). Modifiziert nach E. Humberg, geb. Lieberer [141].

Aus biochemischer Sicht lässt sich das soeben beschriebene Phänomen am ehesten auf die Nähe der Aminosäure R65 zum Lysinrest K67 zurückführen (s. Abb. 5.3 A), dem eine Schlüsselfunktion in der pH-Regulation des Kaliumkanals KCNJ10 zugesprochen wird [52, 55, 56, 139, 140].

Die meisten einwärtsgerichteten Kaliumkanäle werden durch intrazelluläre Ansäuerung inhibiert, wobei sich die pH-Sensitivität der einzelnen Typen merklich unterscheidet [55, 56]. Die strukturelle und funktionelle Gemeinsamkeit der hoch pH-sensitiven Typen ROMK (KCNJ1 = Kir1.1, Funktion/Lokalisation s. Kap. 1.2 und 1.6), KCNJ10 und KCNJ10/KCNJ16

ist ein Lysinrest in der ersten Transmembrandomäne: K80 (ROMK) bzw. K67 (KCNJ10). Die Bedeutsamkeit dieser Aminosäure für das pH-abhängige Gating ist seit Mitte der 1990er Jahre bekannt. Zunächst hielt man den Lysinrest für den eigentlichen pH-Sensor, wobei die ϵ -Aminogruppe als titrierbare Base durch ihren Protonierungsgrad die Porenöffnung regulieren sollte. Entsprechend dieser Annahme würde der ursprüngliche pK_s -Wert von Lysin durch die elektrostatische Interaktion mit Aminosäuren des intrazellulären N- und C-Terminus von pH 10,5 auf pH 6,8 (ROMK) bzw. 6,0 (KCNJ10) gesenkt werden [140, 142, 143].

Neuere Untersuchungen zeigen allerdings, dass das pH-abhängige Gating dieser Kanäle einem weitaus komplexeren Mechanismus unterliegt, in dessen Gesamtheit der Lysinrest K80 bzw. K67 nicht die eigentliche, dennoch eine wichtige Funktion inne hat [55, 56, 138]. Die protonierte ϵ -Aminogruppe des in TM1 gelegenen Lysins soll demnach mit der „backbone“-Carbonylgruppe von A177 (ROMK) bzw. T164 (KCNJ10) - jeweils in TM2 gelegen - eine Wasserstoffbrücke ausbilden; in KCNJ10 wird zudem eine Wasserstoffbrücke zwischen den Seitenketten von K67 und T164 beschrieben. Diese Wasserstoffbrücken scheinen bei höherer Protonenkonzentration ($pH < IC_{50}$) den Geschlossen-Zustand des Kanals zu stabilisieren (s. Abb. 5.3 A).

Aufgrund der engen Nachbarschaft von R65 zu K67 innerhalb des Kaliumkanals KCNJ10 ist es nahe liegend, dass der basische Rest R65 die eben beschriebene Wasserstoffbrücke beeinflusst. Durch die Mutation R65P, also den Austausch des basischen Arginins gegen das neutrale Prolin, könnte demnach die Ausbildung der Wasserstoffbrücke beeinträchtigt und damit die pH-Abhängigkeit der Kanalöffnung verändert werden.

Die in 2010 durch unsere Arbeitsgruppe publizierte EAST/SeSAME-Mutante KCNJ10 R175Q ist wie R65P durch eine Verschiebung der pH-Sensitivität ins Alkalische charakterisiert [87], die jedoch mit einer IC_{50} von pH 9,35 wesentlich stärker ausgeprägt ist. Diese Patch-Clamp-Messungen wurden an Macropatches von *X.laevis*-Oocyten durchgeführt. Letztere sind gegenüber pH-Veränderungen weitaus robuster als CHO- oder HEK293-Zellen.

Ähnlich extreme Veränderungen der pH-Empfindlichkeit wurden für die EAST/SeSAME-Mutationen T164I und R297C beschrieben [91]. Dies ist für T164I als Teil der die pH-Sensitivität bestimmenden Wasserstoffbrücke (s. Abb. 5.3 A) nicht verwunderlich. Auch R297C soll die pH-abhängige Interaktion von K67 und T164 torpedieren, da R297 im gefalteten Protein nahe der besagten Wasserstoffbrücke zu liegen kommt [88]. Außerdem wurde für die Mutation der korrespondierenden Aminosäure in den verwandten Kanälen Kir1.1, Kir2.1 und Kir6.2 gezeigt, dass sie die Interaktion mit dem Kanalaktivator Phosphatidylinositol-bisphosphat (PIP_2) und damit auch das pH-abhängige Gating beeinflusst [144-146].

In Anlehnung an die Erkenntnisse über KCNJ10 R65P wird auch für die später entdeckte Mutante KCNJ10 R65C eine veränderte pH-Sensitivität angenommen, da die Missense-Mutation auf Proteinebene zu ähnlichen Veränderungen führt, nämlich zum Austausch einer basischen gegen eine neutrale Aminosäure. Die Einzelheiten dazu werden die noch ausstehenden elektrophysiologischen Analysen liefern.

Ebenso wird noch zu prüfen sein, inwiefern die pH-Sensitivität der mutierten Kanäle von der Heteromerisierung mit KCNJ16 beeinflusst wird.

Das veränderte pH-Gating stellt also einen wesentlichen pathophysiologischen Aspekt der renalen Salzverlusttubulopathien dar.

Ein klinisches Merkmal der EAST/SeAME-Patienten ist eine milde bis mäßige metabolische Alkalose mit einem Serum-Bikarbonat von 26 - 30 mM [85] bzw. 28 - 33 mM [86]. Durch diese Veränderung des „milieu intérieur“ kann der Organismus möglicherweise die veränderte pH-Sensitivität der mutierten Kaliumkanäle partiell kompensieren – zumindest für Mutationen mit einer moderaten Verschiebung der IC_{50} wie KCNJ10 R65P. Daher sind speziell bei Patienten, die diese Mutationen tragen, ein hochnormaler Serum-pH-Wert anzustreben und all jene Situationen zu vermeiden, die eine Übersäuerung des Organismus begünstigen, z.B. eine Laktatazidose durch exzessive körperliche Betätigung oder eine Subtraktionsazidose bei Diarrhoe ohne Anpassung der Dauermedikation.

6 Zusammenfassung

Die postnatale Entwicklung der Säugetierniere ist ein vielschichtiges und dynamisches Geschehen, das als Balanceakt zwischen den Bedürfnissen des reifenden Organismus und den unreifen anatomischen Strukturen anzusehen ist.

Für die Maus als ein etabliertes Modell der Nierenforschung ist die postnatale Entwicklung der Nierenfunktion relativ wenig erforscht. Wegen der oft eingeschränkten Überlebensfähigkeit genetisch modifizierter Mäuse ist der Untersuchungszeitraum auf die ersten Lebenswochen beschränkt. Mangels Vergleichsdaten von heranwachsenden Wildtyp-Mäusen in der Literatur beleuchtet diese Arbeit detailliert die alterabhängige renale Ausscheidung von Kreatinin, K^+ , Na^+ , Ca^{2+} und Mg^{2+} sowie das Expressionsprofil von bedeutenden Ionenkanälen des distalen Tubulus. Dies soll wichtige Informationen für die Planung und Interpretation von weiteren Versuchen mit Knockout-Tieren bieten.

Aufgrund der zentralen Bedeutung der Nieren für den Salz-, Wasser- und Säure-Basen-Haushalt haben bereits kleinste funktionelle Störungen besonders während der Entwicklung fatale Konsequenzen, wie es das komplexe Krankheitsbild EAST (*epilepsy, ataxia, sensorineural deafness, tubulopathy*) alias SeSAME (*seizures, sensorineural deafness, ataxia, mental retardation, electrolyte imbalance*) aufzeigt. Ursache dieser autosomal-rezessiven Erbkrankheit sind verschiedene „loss-of-function“-Mutationen des einwärtsgerichtenden Kaliumkanals KCNJ10 (Kir4.1), der nebst ZNS, Retina und Innenohr vor allem im distalen Konvolut (DCT) der Niere exprimiert wird. Dort garantiert er vermutlich als Heteromer mit KCNJ16 (Kir5.1) die basolaterale K^+ -Leitfähigkeit, stabilisiert das Membranpotential, hält dank des basolateralen K^+ -Recyclings die Na^+/K^+ -ATPase in Gang und ist aufgrund der pH-Abhängigkeit am Säure-Basen-Haushalt beteiligt. Gegenstand meiner Untersuchungen waren die elektrophysiologischen Eigenschaften der bisher am häufigsten diagnostizierten EAST/SeSAME-Mutation KCNJ10 c.G194C (entspricht p.R65P) sowie der renale Phänotyp der KCNJ10-Knockout-Maus.

Die Analyse der altersabhängigen renalen Ausscheidungsfunktion erfolgte in heranwachsenden C57BL6-Wildtyp-Mäusen (pp1 bis pp84). Es zeigte sich ein steter Anstieg der Kreatininkonzentration im Urin von 0,65 mM (pp1) auf ca. 4 mM (ab pp21). Für die Ausscheidung der Kationen K^+ , Na^+ , Ca^{2+} und Mg^{2+} ergaben sich für jedes Ion charakteristische Verläufe, wobei sich die größten Veränderungen kurz nach der Geburt und während der Abstillperiode (pp15 - pp20) vollzogen. Diese funktionelle Dynamik spiegelt sich in der Morphogenese und in der

zunehmenden Transportproteinexpression wider: Die histologische Ausreifung war durch eine zentrifugale Differenzierung und eine sukzessive Zonierung des Parenchyms charakterisiert. Auf zellulärer Ebene bildete sich die für Epithelien typische Polarität aus, was im distalen Tubulus von der zunehmenden Expression der luminalen (NKCC2, NCC, AQP2) und basolateralen (KCNJ10, KCNJ16) Transportproteine begleitet war.

Die EAST/SeSAME-Mutation KCNJ10 p.R65P wurde in der vorliegenden Arbeit als Homomer und als Heteromer mit KCNJ16 WT in CHO- und HEK293-Zellen exprimiert und mittels Patch-Clamp-Technik analysiert. Das Homomer KCNJ10 p.R65P wies unter den gegebenen Bedingungen (pH 7,4) gegenüber KCNJ10 WT eine mäßig eingeschränkte Kanalaktivität auf, was vorrangig auf einer Verschiebung des pH-sensitiven Bereichs ins Alkalische zurückzuführen ist. Der heteromere Kanal KCNJ10 p.R65P/KCNJ16 WT unterschied sich im Whole-cell-Modus von den Homomeren KCNJ10 WT und KCNJ10 p.R65P durch fehlende Membranhypopolarisation; auf Einzelkanalebene war eine sehr reduzierte Offenwahrscheinlichkeit und damit eine stark eingeschränkte Leitfähigkeit kennzeichnend.

Die biologische Relevanz des KCNJ10 wurde durch einige in-vivo-Experimente an der KCNJ10-Knockout-Maus evident: Letztere verstarb aufgrund des Gendefekts schon innerhalb der ersten Lebenswoche. Neben dem bekannten ZNS-Phänotyp (Ataxie, Epilepsie, Paralyse, Taubheit, Retinaschäden) fanden wir ein gravierendes renales Defizit, das sich funktionell durch eine eingeschränkte Harnkonzentrierung, milde Hyperkaliurie und Hypernatriurie, deutliche Hypocalciurie und Hypomagnesiurie ausdrückte. Morphologisch auffällig war ein massiv dilatiertes Nierenbecken, umgeben von einem schmalen, wenig differenzierten Parenchym.

Der Phänotyp der Knockout-Maus deckt sich weitgehend mit den Symptomen der EAST/SeSAME-Patienten. Angesichts der ungleichen Überlebensfähigkeit scheint der Mensch den Gendefekt effektiver zu kompensieren als die Maus. Diese und weitere kleine Abweichungen sind am ehesten auf Speziesunterschiede und die Art des Gendefekts zurückzuführen: Während in der Maus das KCNJ10-Gen gänzlich ausgeschaltet ist, besitzen die meisten EAST/SeSAME-Mutationen, insbesondere p.R65P, zumindest im heterologen Expressionssystem eine gewisse Restfunktion.

7 Literaturverzeichnis

- [1] Bernard C. Leçons sur les phénomènes de la vie communs aux animaux et aux végétaux. Paris: J.-B. Baillière et fils; 1878.
- [2] Gross CG. Claude Bernard and the Constancy of the Internal Environment. *The Neuroscientist* 1998;4(5):380-5.
- [3] Boron WF, Boulpaep EL. *Medical Physiology*. Philadelphia 2004.
- [4] Nijenhuis T, Vallon V, van der Kemp AW, Loffing J, Hoenderop JG, Bindels RJ. Enhanced passive Ca^{2+} reabsorption and reduced Mg^{2+} channel abundance explains thiazide-induced hypocalciuria and hypomagnesemia. *J Clin Invest* 2005 Jun;115(6):1651-8.
- [5] Hoenderop JG, Bindels RJ. Epithelial Ca^{2+} and Mg^{2+} channels in health and disease. *J Am Soc Nephrol* 2005 Jan;16(1):15-26.
- [6] Xi Q, Hoenderop JG, Bindels RJ. Regulation of magnesium reabsorption in DCT. *Pflugers Arch* 2009 May;458(1):89-98.
- [7] Loffing J, Vallon V, Loffing-Cueni D, Aregger F, Richter K, Pietri L, et al. Altered renal distal tubule structure and renal Na^{+} and Ca^{2+} handling in a mouse model for Gitelman's syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2004 Sep;15(9):2276-88.
- [8] Silbernagl S, Despopoulos A. Niere. In: *Taschenatlas der Physiologie* (5. Auflage). Stuttgart 2001;148-85.
- [9] Welsch U. Harnorgane. In: *Lehrbuch Histologie* (2. Auflage). München 2006;449-72.
- [10] Rohen JW, Lütjen-Drecoll E. Beckenhöhle und Retroperitonealraum - Entwicklung des Urogenitalsystems. In: *Funktionelle Embryologie* (3. Auflage). Stuttgart 2006;107-10.
- [11] Osathanondh V, Potter EL. Development of human kidney as shown by microdissection. IV. Development of tubular portions of nephrons. *Arch Pathol* 1966 Nov;82(5):391-402.
- [12] Larsson L. The ultrastructure of the developing proximal tubule in the rat kidney. *J Ultrastruct Res* 1975 Apr;51(1):119-39.
- [13] Nigam SK, Aperia A, Brenner BM. Development and Maturation of the kidney. In: *Brenner and Rector's: The kidney* (5th edition). Philadelphia 1996;72-98.
- [14] Baum M, Quigley R, Satlin L. Maturation changes in renal tubular transport. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2003 Sep;12(5):521-6.
- [15] Schmitt R, Ellison DH, Farman N, Rossier BC, Reilly RF, Reeves WB, et al. Developmental expression of sodium entry pathways in rat nephron. *Am J Physiol* 1999 Mar;276(3 Pt 2):F367-F381.
- [16] Schmidt U, Horster M. Na-K-activated ATPase: activity maturation in rabbit nephron segments dissected in vitro. *Am J Physiol* 1977 Jul;233(1):F55-F60.
- [17] Rane S, Aperia A. Ontogeny of Na-K-ATPase activity in thick ascending limb and of concentrating capacity. *Am J Physiol* 1985 Nov;249(5 Pt 2):F723-F728.

- [18] Gengler WR, Forte LR. Neonatal development of rat kidney adenylyl cyclase and phosphodiesterase. *Biochim Biophys Acta* 1972 Sep 15;279(2):367-72.
- [19] Vehaskari VM. Ontogeny of cortical collecting duct sodium transport. *Am J Physiol* 1994 Jul;267(1 Pt 2):F49-F54.
- [20] Satlin LM. Regulation of potassium transport in the maturing kidney. *Semin Nephrol* 1999 Mar;19(2):155-65.
- [21] Lelievre-Pegorier M, Merlet-Benichou C, Roinel N, de RC. Developmental pattern of water and electrolyte transport in rat superficial nephrons. *Am J Physiol* 1983 Jul;245(1):F15-F21.
- [22] Al-Dahhan J, Haycock GB, Chantler C, Stimmler L. Sodium homeostasis in term and preterm neonates. I. Renal aspects. *Arch Dis Child* 1983 May;58(5):335-42.
- [23] Sulyok E, Nemeth M, Tenyi I, Csaba IF, Varga F, Gyory E, et al. Relationship between maturity, electrolyte balance and the function of the renin-angiotensin-aldosterone system in newborn infants. *Biol Neonate* 1979;35(1-2):60-5.
- [24] Satlin LM. Postnatal maturation of potassium transport in rabbit cortical collecting duct. *Am J Physiol* 1994 Jan;266(1 Pt 2):F57-F65.
- [25] Van Acker KJ, Scharpe SL, Deprettere AJ, Neels HM. Renin-angiotensin-aldosterone system in the healthy infant and child. *Kidney Int* 1979 Aug;16(2):196-203.
- [26] Rane S, Aperia A, Eneroth P, Lundin S. Development of urinary concentrating capacity in weaning rats. *Pediatr Res* 1985 May;19(5):472-5.
- [27] Siga E, Horster MF. Regulation of osmotic water permeability during differentiation of inner medullary collecting duct. *Am J Physiol* 1991 May;260(5 Pt 2):F710-F716.
- [28] Edelmann CM, Barnett HLT, V. Renal concentrating mechanisms in newborn infants. Effect of dietary protein and water content, role of urea, and responsiveness to antidiuretic hormone. *J Clin Invest* 1960 Jul;39:1062-9.:1062-9.
- [29] Heller H. The water metabolism of newborn infants and animals. *Arch Dis Child* 1951 Jun;26(127):195-204.
- [30] Greger R, Velazquez H. The cortical thick ascending limb and early distal convoluted tubule in the urinary concentrating mechanism. *Kidney Int* 1987 Feb;31(2):590-6.
- [31] Koefoed-Johnsen V, Ussing HH. The nature of the frog skin potential. *Acta Physiol Scand* 1958 Jun 2;42(3-4):298-308.
- [32] Riveira-Munoz E, Chang Q, Bindels RJ, Devuyst O. Gitelman's syndrome: towards genotype-phenotype correlations? *Pediatr Nephrol* 2007 Mar;22(3):326-32.
- [33] Glaudemans B, van der WJ, Scola RH, Lorenzoni PJ, Heister A, van der Kemp AW, et al. A missense mutation in the Kv1.1 voltage-gated potassium channel-encoding gene KCNA1 is linked to human autosomal dominant hypomagnesemia. *J Clin Invest* 2009 Apr;119(4):936-42.
- [34] Vitzthum H, Castrop H, Meier-Meitingner M, Riegger GA, Kurtz A, Kramer BK, et al. Nephron specific regulation of chloride channel CLC-K2 mRNA in the rat. *Kidney Int* 2002 Feb;61(2):547-54.

- [35] Cluzeaud F, Reyes R, Escoubet B, Fay M, Lazdunski M, Bonvalet JP, et al. Expression of TWIK-1, a novel weakly inward rectifying potassium channel in rat kidney. *Am J Physiol* 1998 Dec;275(6 Pt 1):C1602-C1609.
- [36] Nie X, Arrighi I, Kaissling B, Pfaff I, Mann J, Barhanin J, et al. Expression and insights on function of potassium channel TWIK-1 in mouse kidney. *Pflugers Arch* 2005 Dec;451(3):479-88.
- [37] Nusing RM, Pantalone F, Grone HJ, Seyberth HW, Wegmann M. Expression of the potassium channel ROMK in adult and fetal human kidney. *Histochem Cell Biol* 2005 Jun;123(6):553-9.
- [38] Lachheb S, Cluzeaud F, Bens M, Genete M, Hibino H, Lourdel S, et al. Kir4.1/Kir5.1 channel forms the major K⁺ channel in the basolateral membrane of mouse renal collecting duct principal cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008 Jun;294(6):F1398-F1407.
- [39] Tanemoto M, Abe T, Onogawa T, Ito S. PDZ binding motif-dependent localization of K⁺ channel on the basolateral side in distal tubules. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004 Dec;287(6):F1148-F1153.
- [40] Lourdel S, Paulais M, Cluzeaud F, Bens M, Tanemoto M, Kurachi Y, et al. An inward rectifier K(+) channel at the basolateral membrane of the mouse distal convoluted tubule: similarities with Kir4-Kir5.1 heteromeric channels. *J Physiol* 2002 Jan 15;538(Pt 2):391-404.
- [41] Zheng W, Verlander JW, Lynch IJ, Cash M, Shao J, Stow LR, et al. Cellular distribution of the potassium channel KCNQ1 in normal mouse kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007 Jan;292(1):F456-F466.
- [42] Wang W. Renal potassium channels: recent developments. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2004 Sep;13(5):549-55.
- [43] Haverkamp W, Möhning G, Schulze-Bahr E, Wedekind H, Haverkamp F, Eckhardt L, et al. QT-Syndrom. *Journal für Kardiologie - Austrian Journal of Cardiology* 2001, 8 (10) 2001;402-6.
- [44] Heitzmann D, Warth R. No potassium, no acid: K⁺ channels and gastric acid secretion. *Physiology (Bethesda)* 2007 Oct;22:335-41.
- [45] Vallon V, Grahmmer F, Volkl H, Sandu CD, Richter K, Rexhepaj R, et al. KCNQ1-dependent transport in renal and gastrointestinal epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 Dec 6;102(49):17864-9.
- [46] Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, Kurachi Y. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev* 2010 Jan;90(1):291-366.
- [47] Kubo Y, Adelman JP, Clapham DE, Jan LY, Karschin A, Kurachi Y, et al. International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels. *Pharmacol Rev* 2005 Dec;57(4):509-26.
- [48] Pessia M, Tucker SJ, Lee K, Bond CT, Adelman JP. Subunit positional effects revealed by novel heteromeric inwardly rectifying K⁺ channels. *EMBO J* 1996 Jun 17;15(12):2980-7.
- [49] Pearson WL, Dourado M, Schreiber M, Salkoff L, Nichols CG. Expression of a functional Kir4 family inward rectifier K⁺ channel from a gene cloned from mouse liver. *J Physiol* 1999 Feb 1;514(Pt 3):639-53.

- [50] Tanemoto M, Fujita A, Higashi K, Kurachi Y. PSD-95 mediates formation of a functional homomeric Kir5.1 channel in the brain. *Neuron* 2002 Apr 25;34(3):387-97.
- [51] Tanemoto M, Kittaka N, Inanobe A, Kurachi Y. In vivo formation of a proton-sensitive K⁺ channel by heteromeric subunit assembly of Kir5.1 with Kir4.1. *J Physiol* 2000 Jun 15;525 Pt 3:587-92.
- [52] Pessia M, Imbrici P, D'Adamo MC, Salvatore L, Tucker SJ. Differential pH sensitivity of Kir4.1 and Kir4.2 potassium channels and their modulation by heteropolymerisation with Kir5.1. *J Physiol* 2001 Apr 15;532(Pt 2):359-67.
- [53] Yang Z, Xu H, Cui N, Qu Z, Chanchevalap S, Shen W, et al. Biophysical and molecular mechanisms underlying the modulation of heteromeric Kir4.1-Kir5.1 channels by CO₂ and pH. *J Gen Physiol* 2000 Jul 1;116(1):33-45.
- [54] Casamassima M, D'Adamo MC, Pessia M, Tucker SJ. Identification of a heteromeric interaction that influences the rectification, gating, and pH sensitivity of Kir4.1/Kir5.1 potassium channels. *J Biol Chem* 2003 Oct 31;278(44):43533-40.
- [55] Rapedius M, Paynter JJ, Fowler PW, Shang L, Sansom MS, Tucker SJ, et al. Control of pH and PIP₂ gating in heteromeric Kir4.1/Kir5.1 channels by H-Bonding at the helix-bundle crossing 1. *Channels (Austin)* 2007 Sep;1(5):327-30.
- [56] Rapedius M, Fowler PW, Shang L, Sansom MS, Tucker SJ, Baukrowitz T. H bonding at the helix-bundle crossing controls gating in Kir potassium channels 2. *Neuron* 2007 Aug 16;55(4):602-14.
- [57] Rojas A, Cui N, Su J, Yang L, Muhumuza JP, Jiang C. Protein kinase C dependent inhibition of the heteromeric Kir4.1-Kir5.1 channel. *Biochim Biophys Acta* 2007 Sep;1768(9):2030-42.
- [58] Rojas A, Su J, Yang L, Lee M, Cui N, Zhang X, et al. Modulation of the heteromeric Kir4.1-Kir5.1 channel by multiple neurotransmitters via G_αq-coupled receptors. *J Cell Physiol* 2008 Jan;214(1):84-95.
- [59] Konstas AA, Korbmayer C, Tucker SJ. Identification of domains that control the heteromeric assembly of Kir5.1/Kir4.0 potassium channels. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003 Apr;284(4):C910-C917.
- [60] Kuffler SW, Nicholls JG, Orkand RK. Physiological properties of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J Neurophysiol* 1966 Jul;29(4):768-87.
- [61] Neusch C, Rozengurt N, Jacobs RE, Lester HA, Kofuji P. Kir4.1 potassium channel subunit is crucial for oligodendrocyte development and in vivo myelination. *J Neurosci* 2001 Aug 1;21(15):5429-38.
- [62] Neusch C, Papadopoulos N, Muller M, Maletzki I, Winter SM, Hirrlinger J, et al. Lack of the Kir4.1 channel subunit abolishes K⁺ buffering properties of astrocytes in the ventral respiratory group: impact on extracellular K⁺ regulation. *J Neurophysiol* 2006 Mar;95(3):1843-52.
- [63] Higashi K, Fujita A, Inanobe A, Tanemoto M, Doi K, Kubo T, et al. An inwardly rectifying K(+) channel, Kir4.1, expressed in astrocytes surrounds synapses and blood vessels in brain. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001 Sep;281(3):C922-C931.

- [64] Ishii M, Fujita A, Iwai K, Kusaka S, Higashi K, Inanobe A, et al. Differential expression and distribution of Kir5.1 and Kir4.1 inwardly rectifying K⁺ channels in retina. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003 Aug;285(2):C260-C267.
- [65] Nagelhus EA, Horio Y, Inanobe A, Fujita A, Haug FM, Nielsen S, et al. Immunogold evidence suggests that coupling of K⁺ siphoning and water transport in rat retinal Muller cells is mediated by a coenrichment of Kir4.1 and AQP4 in specific membrane domains. *Glia* 1999 Mar;26(1):47-54.
- [66] Kofuji P, Ceelen P, Zahs KR, Surbeck LW, Lester HA, Newman EA. Genetic inactivation of an inwardly rectifying potassium channel (Kir4.1 subunit) in mice: phenotypic impact in retina. *J Neurosci* 2000 Aug 1;20(15):5733-40.
- [67] Marcus DC, Wu T, Wangemann P, Kofuji P. KCNJ10 (Kir4.1) potassium channel knockout abolishes endocochlear potential. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002 Feb;282(2):C403-C407.
- [68] Rozengurt N, Lopez I, Chiu CS, Kofuji P, Lester HA, Neusch C. Time course of inner ear degeneration and deafness in mice lacking the Kir4.1 potassium channel subunit. *Hear Res* 2003 Mar;177(1-2):71-80.
- [69] Huang C, Sindic A, Hill CE, Hujer KM, Chan KW, Sassen M, et al. Interaction of the Ca²⁺-sensing receptor with the inwardly rectifying potassium channels Kir4.1 and Kir4.2 results in inhibition of channel function. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007 Mar;292(3):F1073-F1081.
- [70] Djukic B, Casper KB, Philpot BD, Chin LS, McCarthy KD. Conditional knock-out of Kir4.1 leads to glial membrane depolarization, inhibition of potassium and glutamate uptake, and enhanced short-term synaptic potentiation. *J Neurosci* 2007 Oct 17;27(42):11354-65.
- [71] Kleta R, Bockenhauer D. Bartter syndromes and other salt-losing tubulopathies. *Nephron Physiol* 2006;104(2):73-80.
- [72] Kurtz I. Molecular pathogenesis of Bartter's and Gitelman's syndromes. *Kidney Int* 1998 Oct;54(4):1396-410.
- [73] Naesens M, Steels P, Verberckmoes R, Vanrenterghem Y, Kuypers D. Bartter's and Gitelman's syndromes: from gene to clinic. *Nephron Physiol* 2004;96(3):65-78.
- [74] Bartter FC, Pronove P, Gill JR, Jr., MacCardle RC. Hyperplasia of the juxtaglomerular complex with hyperaldosteronism and hypokalemic alkalosis. A new syndrome. 1962. *J Am Soc Nephrol* 1998 Mar;9(3):516-28.
- [75] Gitelman HJ, Graham JB, Welt LG. A new familial disorder characterized by hypokalemia and hypomagnesemia. *Trans Assoc Am Physicians* 1966;79:221-35.
- [76] Deschenes G, Burguet A, Guyot C, Hubert P, Garabedian M, Dechaux M, et al. Antenatal form of Bartter's syndrome. *Ann Pediatr (Paris)* 1993 Feb;40(2):95-101.
- [77] Seyberth HW, Rascher W, Schweer H, Kuhl PG, Mehls O, Scharer K. Congenital hypokalemia with hypercalciuria in preterm infants: a hyperprostaglandinuric tubular syndrome different from Bartter syndrome. *J Pediatr* 1985 Nov;107(5):694-701.
- [78] Seyberth HW. How can you differentiate neonatal Bartter's syndrome from hyperprostaglandin (-uria) E2 syndrome? *Pediatr Nephrol* 1994 Aug;8(4):407.

- [79] Seyberth HW, Koniger SJ, Rascher W, Kuhl PG, Schweer H. Role of prostaglandins in hyperprostaglandin E syndrome and in selected renal tubular disorders. *Pediatr Nephrol* 1987 Jul;1(3):491-7.
- [80] Landau D, Shalev H, Ohaly M, Carmi R. Infantile variant of Bartter syndrome and sensorineural deafness: a new autosomal recessive disorder. *Am J Med Genet* 1995 Dec 4;59(4):454-9.
- [81] Loffing J, Vallon V, Loffing-Cueni D, Aregger F, Richter K, Pietri L, et al. Altered renal distal tubule structure and renal Na(+) and Ca(2+) handling in a mouse model for Gitelman's syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2004 Sep;15(9):2276-88.
- [82] Bettinelli A, Tosetto C, Colussi G, Tommasini G, Edefonti A, Bianchetti MG. Electrocardiogram with prolonged QT interval in Gitelman disease. *Kidney Int* 2002 Aug;62(2):580-4.
- [83] Vargas-Poussou R, Huang C, Hulin P, Houillier P, Jeunemaitre X, Paillard M, et al. Functional characterization of a calcium-sensing receptor mutation in severe autosomal dominant hypocalcemia with a Bartter-like syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2002 Sep;13(9):2259-66.
- [84] Vezzoli G, Arcidiacono T, Paloschi V, Terranegra A, Biasion R, Weber G, et al. Autosomal dominant hypocalcemia with mild type 5 Bartter syndrome. *J Nephrol* 2006 Jul;19(4):525-8.
- [85] Bockenhauer D, Feather S, Stanescu HC, Bandulik S, Zdebik AA, Reichold M, et al. Epilepsy, ataxia, sensorineural deafness, tubulopathy, and KCNJ10 mutations. *N Engl J Med* 2009 May 7;360(19):1960-70.
- [86] Scholl UI, Choi M, Liu T, Ramaekers VT, Hausler MG, Grimmer J, et al. Seizures, sensorineural deafness, ataxia, mental retardation, and electrolyte imbalance (SeSAME syndrome) caused by mutations in KCNJ10. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009 Apr 7;106(14):5842-7.
- [87] Reichold M, Zdebik AA, Lieberer E, Rapedius M, Schmidt K, Bandulik S, et al. KCNJ10 gene mutations causing EAST syndrome (epilepsy, ataxia, sensorineural deafness, and tubulopathy) disrupt channel function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010 Aug 10;107(32):14490-5.
- [88] Freudenthal B, Kulaveerasingam D, Lingappa L, Shah MA, Brueton L, Wassmer E, et al. KCNJ10 Mutations Disrupt Function in Patients with EAST Syndrome. *Nephron Physiol* 2011 Aug 18;119(3):40-8.
- [89] Parrock S, Hussain S, Issler N, Differ AM, Lench N, Guarino S, et al. KCNJ10 mutations display differential sensitivity to heteromerisation with KCNJ16. *Nephron Physiol* 2013;123(3-4):7-14.
- [90] Scholl UI, Dave HB, Lu M, Farhi A, Nelson-Williams C, Listman JA, et al. SeSAME/EAST syndrome--phenotypic variability and delayed activity of the distal convoluted tubule. *Pediatr Nephrol* 2012 Nov;27(11):2081-90.
- [91] Sala-Rabanal M, Kucheryavykh LY, Skatchkov SN, Eaton MJ, Nichols CG. Molecular mechanisms of EAST/SeSAME syndrome mutations in Kir4.1 (KCNJ10). *J Biol Chem* 2010 Nov 12;285(46):36040-8.
- [92] Meneton P, Ichikawa I, Inagami T, Schnermann J. Renal physiology of the mouse. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000 Mar;278(3):F339-F351.

- [93] Neher E, Sakmann B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 1976 Apr 29;260(5554):799-802.
- [94] Hackbarth H, Hackbarth D. Genetic analysis of renal function in mice. 2. Strain differences in clearances of sodium, potassium, osmolar and free water, and their correlations with body and kidney weight. *Lab Anim* 1982 Jan;16(1):27-32.
- [95] de RC, Stewart J, Morel F. Micropuncture study of urine formation. IV. In the mouse undergoing salt diuresis. *Nephron* 1970 Jul;7(4):350-62.
- [96] Bonilla-Felix M. Development of water transport in the collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004 Dec;287(6):F1093-F1101.
- [97] Epstein FH, Kleeman CR, Pursel S, Hendriks A. The effect of feeding protein and urea on the renal concentrating process. *J Clin Invest* 1957 May;36(5):635-41.
- [98] Benabe JE, Cordova HR. Effect of high-protein diet on renal concentration capacity in rabbits. *Am J Physiol* 1992 Dec;263(6 Pt 2):F1051-F1056.
- [99] Kim YH, Kim DU, Han KH, Jung JY, Sands JM, Knepper MA, et al. Expression of urea transporters in the developing rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002 Mar;282(3):F530-F540.
- [100] Heller H, Lederis K. Maturation of the hypothalamoneurohypophyseal system. *J Physiol* 1959 Sep 2;147:299-314.
- [101] Ostrowski NL, Young WS, III, Knepper MA, Lolait SJ. Expression of vasopressin V1a and V2 receptor messenger ribonucleic acid in the liver and kidney of embryonic, developing, and adult rats. *Endocrinology* 1993 Oct;133(4):1849-59.
- [102] Rajerison RM, Butlen D, Jard S. Ontogenic development of antidiuretic hormone receptors in rat kidney: comparison of hormonal binding and adenylate cyclase activation. *Mol Cell Endocrinol* 1976 Mar;4(4):271-85.
- [103] Bonilla-Felix M, John-Phillip C. Prostaglandins mediate the defect in AVP-stimulated cAMP generation in immature collecting duct. *Am J Physiol* 1994 Jul;267(1 Pt 2):F44-F48.
- [104] Quigley R, Chakravarty S, Baum M. Antidiuretic hormone resistance in the neonatal cortical collecting tubule is mediated in part by elevated phosphodiesterase activity. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004 Feb;286(2):F317-F322.
- [105] Bonilla-Felix M, Jiang W. Aquaporin-2 in the immature rat: expression, regulation, and trafficking. *J Am Soc Nephrol* 1997 Oct;8(10):1502-9.
- [106] Falk G. Maturation of renal function in infant rats. *Am J Physiol* 1955 Apr;181(1):157-70.
- [107] Lorenz JM. Assessing fluid and electrolyte status in the newborn. *National Academy of Clinical Biochemistry. Clin Chem* 1997 Jan;43(1):205-10.
- [108] Gurkan S, Estilo GK, Wei Y, Satlin LM. Potassium transport in the maturing kidney. *Pediatr Nephrol* 2007 Jul;22(7):915-25.
- [109] Delgado MM, Rohatgi R, Khan S, Holzman IR, Satlin LM. Sodium and potassium clearances by the maturing kidney: clinical-molecular correlates. *Pediatr Nephrol* 2003 Aug;18(8):759-67.

- [110] Malnic G, Klose RM, Giebisch G. Micropuncture study of renal postassium escretion in the rat. *Am J Physiol* 1964 Apr;206:674-86.
- [111] Malnic G, Klose RM, Giebisch G. Microperfusion study of distal tubular potassium and sodium transfer in rat kidney. *Am J Physiol* 1966 Sep;211(3):548-59.
- [112] Bass JK, Chan GM. Calcium nutrition and metabolism during infancy. *Nutrition* 2006 Oct;22(10):1057-66.
- [113] David L, Anast CS. Calcium metabolism in newborn infants. The interrelationship of parathyroid function and calcium, magnesium, and phosphorus metabolism in normal, "sick," and hypocalcemic newborns. *J Clin Invest* 1974 Aug;54(2):287-96.
- [114] Graham RW, Porter GP. Fetal-maternal plasma calcium relationships in the rabbit. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci* 1971 Jul;56(3):160-8.
- [115] Shami Y, Radde IC. Calcium-stimulated ATPase of guinea pig placenta. *Biochim Biophys Acta* 1971 Dec 3;249(2):345-52.
- [116] Thomas ML, Anast CS, Forte LR. Regulation of calcium homeostasis in the fetal and neonatal rat. *Am J Physiol* 1981 Apr;240(4):E367-E372.
- [117] Chattopadhyay N, Baum M, Bai M, Riccardi D, Hebert SC, Harris HW, et al. Ontogeny of the extracellular calcium-sensing receptor in rat kidney. *Am J Physiol* 1996 Sep;271(3 Pt 2):F736-F743.
- [118] Matos P, Duarte-Silva M, Drukker A, Guignard JP. Creatinine reabsorption by the newborn rabbit kidney. *Pediatr Res* 1998 Nov;44(5):639-41.
- [119] Guignard JP, Drukker A. Why do newborn infants have a high plasma creatinine? *Pediatrics* 1999 Apr;103(4):e49.
- [120] Alt JM, Colenbrander B, Forsling ML, Macdonald AA. Perinatal development of tubular function in the pig. *Q J Exp Physiol* 1984 Oct;69(4):693-702.
- [121] Coulthard MG, Hey EN, Ruddock V. Creatinine and urea clearances compared to inulin clearance in preterm and mature babies. *Early Hum Dev* 1985 May;11(1):11-9.
- [122] Wagner CA. New roles for renal potassium channels. *J Nephrol* 2010 Jan;23(1):5-8.
- [123] Arcangeli A, Bianchi L, Becchetti A, Faravelli L, Coronello M, Mini E, et al. A novel inward-rectifying K⁺ current with a cell-cycle dependence governs the resting potential of mammalian neuroblastoma cells. *J Physiol* 1995 Dec 1;489(Pt 2):455-71.
- [124] Arcangeli A, Becchetti A, Mannini A, Mugnai G, De FP, Tarone G, et al. Integrin-mediated neurite outgrowth in neuroblastoma cells depends on the activation of potassium channels. *J Cell Biol* 1993 Sep;122(5):1131-43.
- [125] Braun GS. Ionenkanäle während der Nephrogenese - Expressionsmuster und funktionelle Bedeutung. Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der Ludwigs-Maximilians-Universität. München 2003.
- [126] Horster M. Principles of nephron differentiation. *Am J Physiol* 1978 Nov;235(5):F387-F393.
- [127] Horster M. Expression of ontogeny in individual nephron segments. *Kidney Int* 1982 Nov;22(5):550-9.

- [128] Larsson L, Aperia A, Elinder G. Structural and functional development of the nephron. *Acta Paediatr Scand Suppl* 1983;305:56-60.
- [129] Lorenz JN, Baird NR, Judd LM, Noonan WT, Andringa A, Doetschman T, et al. Impaired renal NaCl absorption in mice lacking the ROMK potassium channel, a model for type II Bartter's syndrome. *J Biol Chem* 2002 Oct 4;277(40):37871-80.
- [130] Satlin LM. Maturation of renal potassium transport. *Pediatr Nephrol* 1991 Mar;5(2):260-9.
- [131] Stephenson G, Hammet M, Hadaway G, Funder JW. Ontogeny of renal mineralocorticoid receptors and urinary electrolyte responses in the rat. *Am J Physiol* 1984 Oct;247(4 Pt 2):F665-F671.
- [132] Khuri RN, Strieder N, Wiederholt M, Giebisch G. Effects of graded solute diuresis on renal tubular sodium transport in the rat. *Am J Physiol* 1975 Apr;228(4):1262-8.
- [133] Good DW, Wright FS. Luminal influences on potassium secretion: sodium concentration and fluid flow rate. *Am J Physiol* 1979 Feb;236(2):F192-F205.
- [134] Warth R. Potassium channels in epithelial transport. *Pflugers Arch* 2003 Aug;446(5):505-13.
- [135] Ookata K, Tojo A, Suzuki Y, Nakamura N, Kimura K, Wilcox CS, et al. Localization of inward rectifier potassium channel Kir7.1 in the basolateral membrane of distal nephron and collecting duct. *J Am Soc Nephrol* 2000 Nov;11(11):1987-94.
- [136] Williams DM, Lopes CM, Rosenhouse-Dantsker A, Connelly HL, Matavel A, Uchi J, et al. Molecular basis of decreased Kir4.1 function in SeSAME/EAST syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2010 Dec;21(12):2117-29.
- [137] Metzger D, Chambon P. Site- and time-specific gene targeting in the mouse. *Methods* 2001 May;24(1):71-80.
- [138] Tucker SJ, Imbrici P, Salvatore L, D'Adamo MC, Pessia M. pH dependence of the inwardly rectifying potassium channel, Kir5.1, and localization in renal tubular epithelia. *J Biol Chem* 2000 Jun 2;275(22):16404-7.
- [139] Leng Q, MacGregor GG, Dong K, Giebisch G, Hebert SC. Subunit-subunit interactions are critical for proton sensitivity of ROMK: evidence in support of an intermolecular gating mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 Feb 7;103(6):1982-7.
- [140] Schulte U, Hahn H, Konrad M, Jeck N, Derst C, Wild K, et al. pH gating of ROMK (K(ir)1.1) channels: control by an Arg-Lys-Arg triad disrupted in antenatal Bartter syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 Dec 21;96(26):15298-303.
- [141] Lieberer E. Basolaterale Kaliumkanäle im distalen Tubulus: Determinanten der renalen Salzresorption (Diplomarbeit im Studienfach Biologie). Regensburg. 2010.
- [142] Fakler B, Schultz JH, Yang J, Schulte U, Brandle U, Zenner HP, et al. Identification of a titratable lysine residue that determines sensitivity of kidney potassium channels (ROMK) to intracellular pH. *EMBO J* 1996 Aug 15;15(16):4093-9.
- [143] Schulte U, Fakler B. Gating of inward-rectifier K⁺ channels by intracellular pH. *Eur J Biochem* 2000 Oct;267(19):5837-41.
- [144] Lopes CM, Zhang H, Rohacs T, Jin T, Yang J, Logothetis DE. Alterations in conserved Kir channel-PIP2 interactions underlie channelopathies. *Neuron* 2002 Jun 13;34(6):933-44.

- [145] Shyng SL, Cukras CA, Harwood J, Nichols CG. Structural determinants of PIP(2) regulation of inward rectifier K(ATP) channels. *J Gen Physiol* 2000 Nov;116(5):599-608.
- [146] Huang CL, Feng S, Hilgemann DW. Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP2 and its stabilization by Gbetagamma. *Nature* 1998 Feb;391(6669):803-6.

8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Ontogenese der Nageriere: Na^+/K^+ -ATPase und Salztransport im Sammelrohr.	9
Abb. 1.2	Transportmodell für die Na^+ -, Cl^- -, Mg^{2+} - und Ca^{2+} -Resorption im distalen Konvolut (DCT).	11
Abb. 1.3	Membrantopologie der Kaliumkanäle KCNJ10 (Kir4.1) und KCNJ16 (Kir5.1) bei Mensch und Maus.	13
Abb. 1.4	Organspezifisches mRNA-Expressionsmuster des humanen und murinen KCNJ10 und KCNJ16 (Auswahl).	15
Abb. 1.5	Überblick EAST/SeSAME-Syndrom.	21
Abb. 3.1	hKCNJ10 in pIRES CD8 (Plasmidkarte).	35
Abb. 3.2	Patch-Clamp-Technik: Messanordnung und Konfigurationen.	41
Abb. 4.1	Körperwachstum von C57BL6 Wildtyp-Mäusen während der ersten drei Lebensmonate.	44
Abb. 4.2	Morphologische Veränderung der Mauseniere während des ersten Lebensmonats.	45
Abb. 4.3	Expression des Natrium-Kalium-Chlorid-Cotransporters NKCC2 in der Niere einer C57BL6 Wildtyp-Maus zum Zeitpunkt pp1, pp7, pp14 und pp56.	48
Abb. 4.4	Expression des Natrium-Chlorid-Cotransporters NCC in der Niere einer C57BL6 Wildtyp-Maus zum Zeitpunkt pp1, pp7, pp14 und pp56.	49
Abb. 4.5	Expression des ADH-sensitiven Wasserkanals Aquaporin 2 (AQP2) in der Niere einer C57BL6 Wildtyp-Maus zum Zeitpunkt pp1, pp7, pp14 und pp56.	50
Abb. 4.6	Expression des einwärtsgerichtenden Kaliumkanals KCNJ10 in der Niere einer C57BL6 Wildtyp-Maus zum Zeitpunkt pp1, pp7, pp14 und pp56.	51
Abb. 4.7	Expression des einwärtsgerichtenden Kaliumkanals KCNJ16 in der Niere einer C57BL6 Wildtyp-Maus zum Zeitpunkt pp1, pp7, pp14 und pp56.	52
Abb. 4.8	Renale Ausscheidungsfunktion von C57BL6 Wildtyp-Mäusen während der ersten drei Lebensmonate.	55
Abb. 4.9	Körperwachstum und Überleben von SV129 Mäusen des Genotyps Wildtyp (WT), heterozygot-KCNJ10-knockout (HE) und homozygot-KCNJ10-knockout (KO) während der ersten zehn Lebenstage.	56
Abb. 4.10	Morphologie einer 7 Tage alten Wildtyp(WT)- und KCNJ10-Knockout(KO)-Mauseniere.	57
Abb. 4.11	Renale Ausscheidungsfunktion von SV129 Mäusen des Genotyps Wildtyp (WT), heterozygot-KCNJ10-knockout (HE) und homozygot-KCNJ10-knockout während der ersten zehn Lebenstage.	59

Abb. 4.12	Membranpotential, transmembranöser Strom und Barium-Effekt in transfizierten CHO-Zellen: KCNJ10 (J10) WT, KCNJ10 (J10) R65P und KCNJ16 (J16) WT als Mono- und Coexpression, scheintransfizierte Kontrollzellen (Originalexperimente).	62
Abb. 4.13	Einzelkanalströme in transfizierten HEK293-Zellen: KCNJ10 (J10) WT und KCNJ10 (J10) R65P als Mono- und Coexpression mit KCNJ16 (J16) WT.	63
Abb. 5.1	Salztransport im DCT und Modell zur Entstehung der EAST/SeSAME-Tubulopathie.	71
Abb. 5.2	Ausscheidungsfunktion der KCNJ10-Knockout-Maus (KO) zwischen dem 3. und 6. Lebenstag im Vergleich zur Kontrolle Wildtyp (WT) und heterozygot-KCNJ10-knockout (HE).	74
Abb. 5.3	Biochemische und molekulargenetische Betrachtung der EAST/SeSAME-Mutationen innerhalb der ersten Transmembrandomäne des KCNJ10.	81
Abb. 5.4	pH-Sensitivität der homomeren Einzelkanäle KCNJ10 WT und KCNJ10 R65P, exprimiert in HEK293-Zellen.	82

9 Abkürzungsverzeichnis

Gängige Abkürzungen aus der Biochemie und Molekularbiologie, S.I.-Einheiten, davon abgeleitete Einheiten und Formelzeichen der Elemente werden als bekannt vorausgesetzt.

ADH	Antidiuretisches Hormon
ANF	Antinatriuretischer Faktor
AQP2	Aquaporin 2
BS	Bartter-Syndrom
C57BL6	Mausinzuchtlinie, häufig eingesetzt als trangeses Tiermodell
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CaSR	<i>Calcium-Sensing-Receptor</i>
CD	Sammelrohr (<i>Collecting Duct</i>)
CD8	<i>Cluster of Differentiation</i> Typ 8, in vivo auf zytotoxischen T-Zellen exprimiert
CDS	Kodierende Sequenz eines Gens (<i>Coding DNA Sequence</i>)
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i> (Zelllinie)
CLC-Kb	nierenspezifischer Calciumkanal Typ b
CNT	Verbindungstubulus (<i>Connecting Tubule</i>)
DCT	distales Konvolut (<i>Distale Convolute Tubule</i>)
EAST	Syndrom, verursacht durch Mutationen des KCNJ10, umfasst die Symptome „ <i>epilepsy, ataxia, sensorineural deafness, tubulopathy</i> “ (Synonym: SeSAME)
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GS	Gitelman-Syndrom
HE	heterozygot (Genotyp)
HE-Färbung	Hämatoxylin/Eosin-Färbung
HEK293	<i>Human Embryonic Kidney 293</i> (Zelllinie)
HO	homozygot (Genotyp)
HUGO	<i>Human Genome Organisation</i>
hXYZ	humanes Homolog des Gens oder Proteins XYZ
i.e.	<i>id est</i> (lat.: das ist, das heisst)
IC₅₀	Konzentration eines Inhibitors, bei der eine 50%-ige Inhibition erreicht wird. Hier: Protonenkonzentration bei halbmaximale Kanalaktivität
IF	Immunfluoreszenz
IUPHAR	<i>International Union of Basic and Clinical Pharmacology</i>
KCNJ	Familie der einwärtsgerichtenden Kaliumkanäle (K^+ channel J), eigentlich nur Bezeichnung des Gens (HUGO-Klassifikation)

Kir	Familie der einwärtsgerichtenden Kaliumkanäle (K^+ <i>inward rectifier</i>), eigentlich nur Bezeichnung des Proteins (IUPHAR-Klassifikation)
Krea	Kreatinin
mXYZ	murines Homolog des Gens oder Proteins XYZ
n	Anzahl
NCC	NaCl-Cotransporter
NCX	Na^+/Ca^{2+} -Austauscher
NKCC2	$Na^+-K^+-Cl^-$ -Cotransporter Isoform 2
NotI	Restriktionsendonuklease, isoliert aus dem Bakterium <i>Nocardia otitidis-cavarium</i>
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i> : Datenbank der humanen Gene und genetischen Störungen, vom <i>National Center for Biotechnology Information</i> (NCBI)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PIP₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
pIRES	Bicistronischer Vektor, der ein IRES (<i>internal ribosomal entry site</i>) enthält und die gleichzeitige Expression zweier Transgene in einer Zielzelle ermöglicht.
pK_s	Säurekonstante
pp	Alter der Tiere in Tagen nach Geburt (<i>post partum</i>)
PT	proximaler Tubulus (<i>Proximal Tubule</i>)
PTH	Parathormon
ROMK	<i>Renal Outer Medullary Potassium</i> (K^+) <i>channel</i>
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (<i>Standard Error of the Mean</i>)
SeSAME	Syndrom, verursacht durch Mutationen des KCNJ10, umfasst die Symptome „ <i>seizures, sensorineural deafness, ataxia, mental retardation, electrolyte imbalance</i> “ (Synonym: EAST)
SV129	Mausinzuchtlinie, geeignet zur Herstellung von Gen-Knockins und Gen-Knockouts
TAL	dicker aufsteigender Teil der Henle-Schleife (<i>Thick Ascending Limb</i>)
TM	Transmembrandomäne
TRPM	Familie der <i>transient receptor potential ion channels</i> , Melastatin-Unterfamilie
TRPV	Familie der <i>transient receptor potential ion channels</i> , Vanilloid-Rezeptor-Unterfamilie
WT	Wildtyp, wildtypisch (Genotyp)

10 Anhang

10.1 Bisherige Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

Veröffentlichungen:

Reichold M, Zdebik AA, Lieberer E, Rapedius M, **Schmidt K**, Bandulik S, Sterner C, Tegtmeier I, Penton D, Baukrowitz T, Hulton SA, Witzgall R, Ben-Zeev B, Howie AJ, Kleta R, Bockenhauer D, Warth R.

KCNJ10 gene mutations causing EAST syndrome (epilepsy, ataxia, sensorineural deafness, and tubulopathy) disrupt channel function.

Proc Natl Acad Sci U S A 2010 Aug 10;107(32):14490-5.

Bandulik S, **Schmidt K**, Bockenhauer D, Zdebik AA, Humberg E, Kleta R, Warth R, Reichold M. *The salt-wasting phenotype of EAST syndrome, a disease with multifaceted symptoms linked to the KCNJ10 K(+) channel.*

Pflugers Arch 2011 Apr;461(4):423-35.

Schmidt K, Ripper M, Tegtmeier I, Humberg E, Sterner C, Reichold M, Warth R, Bandulik S. *Dynamics of renal electrolyte excretion in growing mice.*

Nephron Physiol 2013 Nov 26;124(3-4):7-13.

Kongressbeiträge (Poster und Vorträge):

Bandulik S, **Schmidt K**, Sterner C, Kolb G, Meyer C, Tegtmeier I, Reichold M, Warth R. *Dynamik der renalen Elektrolytausscheidung bei neugeborenen Mäusen* (Poster).

Kongress der Gesellschaft für Nephrologie in Göttingen 2009.

Reichold M, Lieberer E, Zdebik A, Bandulik S, **Schmidt K**, Sterner C, Tegtmeier I, Bockenhauer D, Kleta R, Warth R.

Biophysical consequences of KCNJ10 mutations causing EAST syndrome (Poster).

89. Jahrestagung der Deutschen physiologischen Gesellschaft in Kopenhagen 2010.

Humberg E, **Schmidt K**, Zdebik A, Rapedius M, Warth R, Bandulik S, Sterner C, Tegtmeier I, Penton D, Baukrowitz T, Hulton SA, Witzgall R, Ben-Zeev B, Howie A, Kleta R, Bockenhauer D, Reichold M.

KCNJ10 gene mutations causing EAST syndrome decrease channel function (Poster).

90. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft in Regensburg 2011.

Humberg E, Ripper M, **Schmidt K**, Bandulik S, Tegtmeier I, Witzgall R, Meese C, Schmidt H, Warth R, Reichold M.

The physiological and pathophysiological relevance of the inwardly rectifying potassium channel Kir5.1 (KCNJ16) in the kidney (Poster).

91. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft in Dresden 2012.

Bandulik S, **Schmidt K**, Ripper M, Sterner C, Tegtmeier I, Warth R.

Renal excretion of electrolytes in developing mice (Vortrag).

91. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft 2012 in Dresden.

10.2 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Die elektrophysiologischen Untersuchungen zur KCNJ10-Mutante R65P wurden von Evelyn Humberg geb. Lieberer und mir gemeinsam durchgeführt. Die Resultate sind daher nicht mein alleiniges geistiges Eigentum. Die betroffenen Daten hat E. Humberg bereits im Rahmen ihrer Diplomarbeit publiziert und sie sind in der vorliegenden Arbeit entsprechend gekennzeichnet.

Die im Methodenteil und in der Danksagung aufgeführten Personen haben mir in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Diese Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.



Katharina Schmidt

Regensburg, 07.07.2014

11 Danksagung

An dieser Stelle will ich all jenen Personen herzlich danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein größter Dank gilt Prof. Dr. Warth für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung der Mittel zur Durchführung der Arbeit und die allseitige wissenschaftliche Betreuung. Insbesondere danke ich ihm für seine stete Diskussionsbereitschaft, für seine Akzeptanz meiner Hartnäckigkeit und für seine eigene Beharrlichkeit.

Im Weiteren möchte ich mich bei Dr. Sascha Bandulik bedanken, der mich bei der Erhebung und Auswertung der murinen Ausscheidungsdaten unterstützte.

Für die effektive Zusammenarbeit bei den elektrophysiologischen Untersuchungen danke ich Dr. Markus Reichold und speziell Evelyn Humberg, deren Diplomarbeit im Rahmen dieser Tätigkeit entstand.

Ein besonderer Dank gilt Christina Sterner, die den molekularbiologischen Anteil meiner Arbeit begleitete und auch bei allen anderen Schwierigkeiten stets ein offenes Ohr hatte.

Außerdem danke ich Ines Tegtmeier für ihre große Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit.

Für die Kationenmessung am Atomabsorptionsspektrometer möchte ich meinen Dank an Günter Kolb (Institut für Botanik) richten. Genauso danke ich Prof. Dr. Armin Kurtz für die Bereitstellung des Invertmikroskops Axiovert 200M.

Auch Prof. Dr. Robert Kleta sei besonders gedankt, denn erst durch seine rege klinische und experimentelle Tätigkeit wurde das EAST-Syndrom entdeckt und zum Gegenstand unserer Forschung.

Der innigste Dank gilt meinen Eltern Johanna und Michael dafür, dass sie mich im Rahmen dieser Arbeit und meines Studiums unermüdlich ideell und materiell unterstützen und jederzeit zur Verwirklichung meiner Pläne beitragen.

Zuletzt danke ich herzlich für die Unterstützung durch Markus und meine beiden Geschwister.